

Aus dem Pharmakologischen Institut in Marburg
Direktor: Prof. Dr. med. W. Schmid

Das Verhalten der Enzymspiegel der Leber während der durch Pharmaka induzierten Vergrößerung

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der gesamten Medizin
der hohen Medizinischen Fakultät
der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von

Heinrich Mieke
aus Heuckewalde Krs. Zeitz

Marburg 1967

Fotodruck von Erich Mauersberger in Marburg

Aus dem Pharmakologischen Institut in Marburg
Direktor: Prof. Dr. med. W. Schmid

Das Verhalten der Enzym Spiegel der Leber während der durch Pharmaka induzierten Vergrößerung



Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der gesamten Medizin
der hohen Medizinischen Fakultät
der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von

Heinrich Mieke

aus Heuckewalde Krs. Zeitz

Marburg 1967

Fotodruck von Erich Mauersberger in Marburg



Angenommen von der Medizinischen Fakultät
der Universität Marburg am 4.7.1967

gedruckt mit Genehmigung der Fakultät

Dekan: Prof.Dr.med.et Dr.med.dent.habil.H. Heuser

Referent: Prof.Dr.med. W. Kunz

Correferent: Prof.Dr.med. W. Schmid

Meinen Eltern



Digitized by the Internet Archive
in 2026

INHALTSVERZEICHNIS

=====

	<u>Seite</u>
A. Einleitung	1
B. Methode	3
I. Tiermaterial und Tierhaltung	3
II. Präparate und Applikationsweise	3
III. Entnahme und Aufbereitung der Gewebe	4
a) Gewebsentnahme	4
b) Extraktaufbereitung	4
c) Fraktionierung	4
IV. Bestimmung der Enzymaktivitäten	5
Berechnung der Enzymaktivitäten	10
V. Bestimmung des Proteins	11
C. Experimenteller Teil	12
I. Beziehung zwischen induzierter Lebervergrößerung und der Aktivierung mikrosomaler Enzyme	12
II. Der Verlauf extramikrosomaler Enzymgehalte während der Lebervergrößerung	15
1) Wirkung von Phenobarbital	16
2) Die Wirkung nicht induzierender Halogenkohlenwasserstoffe	20
3) Die Wirkung von Aldrin	22
III. Veränderung der Metabolithgehalte während der durch Phenobarbital induzierten Lebervergrößerung	24
D. Diskussion	25
E. Zusammenfassung	31

A Einleitung

Chronische Zufuhr zahlreicher Fremdstoffe mit sehr unterschiedlichen chemischen und biologischen Eigenschaften führt im Tierexperiment zu einer sehr beträchtlichen Vergrößerung der Leber. (zusammenfassende Literatur bei Kunz et al. 1966) Diese pharmakainduzierte Lebervergrößerung unterscheidet sich durch das Fehlen pathologischer Veränderungen wie Nekrosen, Verfettung oder hydropischer Schwellung von den bisher klassifizierten Hypertrophieformen.

Die meisten der lebervergrößernden Substanzen sind starke Aktivatoren der mikrosomalen Metabolisierungsenzyme (Kunz et al. 1966 und Remmer 1962a); sehr aktive Pharmaka bewirken dabei eine elektronenoptisch nachweisbare Vermehrung der enzymtragenden Strukturen, der glatten Membranen des endoplasmatischen Retikulums (Remmer 1963, Fouts 1965). Es war deshalb eine naheliegende Annahme, die Größenzunahme als Äquivalent dieser Vermehrung der endoplasmatischen Organellen anzusehen. Da die vor allem bei Ratten beobachtete Vergrößerung 10 - 20% der Normalwerte betrug, schien diese Deutung auch quantitativ möglich. Für die bei der weißen Maus durch einige sehr aktive Stoffe bewirkte extreme Leberhypertrophie, die bis zu einer Verdoppelung der Organgröße führen kann, war die Erklärung jedoch unzulänglich. Da Analysen der wesentlichen chemischen Zellbestandteile ergeben hatten, daß die Lebervergrößerung mit einer annähernd äquivalenten Zunahme von Protein, Phosphorlipoiden, RNS und DNS einhergeht, (Kunz 1963, Räker 1965) stellte sich die Frage, ob hier echtes Organwachstum vorliegt. In diesem Falle wäre mit dem Phänomen ein methodisch außerordentlich günstiges Modell für die Analyse der Regulationsmechanismen von Zellwachstum und Zellvermehrung gegeben, da das auslösende Agens und seine initialen Wirkungen sowie die möglichen Folgereaktionen eine weitgehend überschaubare Kausalkette darstellen. Die Beantwortung der Frage nach dem Wesen der Lebervergrößerung war deshalb von großem Interesse. Ein geeignetes Kriterium zu ihrer Beurteilung schien hier das Verhalten der Leberenzyme

während und nach Abschluß der Vergrößerungsperiode zu sein. Bei Vorliegen eines normalen Wachstums wäre eine der Organvergrößerung entsprechende Zunahme aller Enzymgehalte unter Beibehaltung der physiologischen Proportionen zu erwarten. Bei Vorliegen einer isolierten Vermehrung bestimmter Zellorganellen dagegen nur die Aktivierung der hier lokalisierten spezifischen Enzyme.

In der vorliegenden Arbeit wurde deshalb das Verhalten einer Reihe wesentlicher und repräsentativer mikrosomaler mitochondrialer und cytoplasmatischer Enzyme während der pharmakainduzierten Lebervergrößerung geprüft.

Um erste Einblicke in mögliche Induktionsmechanismen zu erhalten, wurden daneben einige von den Enzymaktivitäten abhängige Metabolitspiegel mitbestimmt.

B Methodik

I Tiermaterial und Tierhaltung

Die Versuche wurden mit männlichen Albinomäusen vom Stamm Z 2 der Bundesforschungsanstalt für Viruserkrankungen der Tiere, Tübingen, durchgeführt. Die Tiere wurden in Makrolon- oder Metallkäfigen in Gruppen von 10 - 20 Stück gehalten. Trockenfutter der Firma Latz und Trinkwasser aus Saugflaschen standen ihnen *ad libitum* zur Verfügung. Nach Eintreffen der Mäuse im Institut wurde mit dem Beginn der Versuche noch einige Tage gewartet, damit sich die Tiere adaptieren konnten.

II Präparate und Applikationsweise

Folgende Pharmaka kamen zur Anwendung:

1. Phenobarbital (Luminal) ^R	10 mg bis 150 mg/kg
2. Hexobarbital (Evipan) ^R	150 mg/kg
3. Eunarcon ^R	200 mg/kg
4. Nikethamid (Coramin) ^R	200 mg/kg
5. Gluthetimid (Doriden) ^R	200 mg/kg
6. Aldrin	0,2 mg bis 10 mg/kg
7. Chlorphenothan (DDT)	50 mg/kg
8. 3, 4-Benzpyren	50 mg/kg
9. Penthran 1%ig 1 Stunde)	per inhalationen
10. Halothan 1%ig 1 Stunde)	

Die Substanzen 1 - 5 wurden in Form ihrer wasserlöslichen Natriumsalze dem Trinkwasser zugegeben. In verschiedenen Versuchen war ermittelt worden, daß die tägliche Trinkmenge einer 25 g schweren Maus bei 5 ml pro Tag liegt. Dieser Wert lag der Berechnung der erforderlichen Medikamentkonzentrationen im Trinkwasser zugrunde. Aldrin, DDT und Benzpyren wurden in Mazolapel gelöst mit einer Schlundsonde appliziert. Die Gaskurkotika wurden mit Hilfe eines Verdampfers der Firma Dräger dosiert.

III Entnahme und Aufbereitung der Gewebe

a) Gewebsentnahme

Die Tiere wurden gewogen und mit einem Schrenschlag dekapitiert. Nach vollständiger Ausblutung wurde die Leber herauspräpariert und gewogen. Bei allen Versuchen entfernten wir die Gallenblase.

b) Extraktzubereitung

1 g Leber wurde in 10 ml Saccharoselösung 0,25 Mol. pH 7,2 unter Verwendung eines Potterhomogenisators (mit Glasstempel) unter konstanten Bedingungen bei 0° C homogenisiert. Saccharoselösung zur Fraktionierung:

Saccharose pro Inj.	85,5 g = 0,25 Mol
Aethylendiamin-tetraacetat = EDTA (Dinatriumsalz)	2,7 g = 0,1 Mol
Einstellung auf pH mit 1 n NaOH.	7,2
Aqua bidestillata	ad 1000,0

Bei einem Teil der Versuche wurde das Lebergewebe mit einem Ultra-Turrax in 1/150 molarem Phosphatpuffer homogenisiert. (3 x 20 Sek. bei maximaler Umdrehungszahl) Bei der Herstellung des Homogenats zur Bestimmung der Glyzerophosphatoxydase wurde ein Potter mit Teflonstempel benutzt.

c) Fraktionierung

Das gesamte Homogenat wurde zuerst 10 Min. bei 10 000 g zentrifugiert. Dabei sedimentierten die Kerne und die Mitochondrien. Der Überstand (Plasma und Mikrosomen) wurden zur weiteren Trennung 60 Min. bei 100 000 g zentrifugiert. Die sedimentierten Mikrosomen wurden in 10 ml TRAPuffer pH 7,6 aufgenommen und suspendiert. Der erste Niederschlag, der Kerne und Mitochondrien enthielt, wurde zur Bestimmung der α -GP/Ox in 10 ml TRA-Puffer rehomogenisiert. Die Gegenwart der Kerne störte bei der Bestimmung der mitochondrialen α -GP/Ox nicht. Es zeigte sich bei allen Enzymen, daß es keine Rolle spielt, ob sie mit

Saccharoselösung oder Phosphatpuffer extrahiert wurden.

IV Bestimmung der Enzymaktivitäten

Die Enzymaktivitäten wurden spektrophotometrisch mit Hilfe der optischen Tests nach Warburg und Bücher (Warburg 1938, Beisenherz et al. 1953, Bergmeyer 1962) bestimmt. Bei einem Teil der Versuche verwendeten wir ein Eppendorphotometer, die Messung erfolgte bei 360 m μ . Der größte Teil der Analysen wurde mit dem Zeissphotometer RMQ II durchgeführt, die Messung erfolgte bei 340 m μ . Die Extinktionsänderungen wurden mit Hilfe eines Linienschreibers mit Transformationsstufe in log. Masstab fortlaufend registriert. Die Messungen wurden prinzipiell in Küvetten von 10 mm Schichtdicke bei Zimmertemperatur durchgeführt. Zur Erzielung optimal auswertbarer Laufgeschwindigkeiten wurden die Extrakte den Durchschnittsaktivitäten entsprechend verdünnt. Die zum Test erforderlichen Substanzen und der Extrakt wurden in die Küvette pipettiert. Nach einem kurzen Vorlauf bis zur Konstanz des Ausgangswertes wurde die "Startersubstanz" mit Hilfe eines an einem Ende umgebogenen Kunststoffstäbchens hinzugegeben. Den einzelnen Tests lagen folgende Reaktionsgleichungen und Ansätze zu Grunde:

Bestimmung der einzelnen Enzyme

a) DPN-H anhängige Enzyme

1. LDH

Laktatdehydrogenase

Reaktionsgleichung:

BTS + DPN-H $\xrightarrow{\text{LDH}}$ Laktat + DPN

TRA-Puffer pH7,6		0,96 ml	
DPN-H	0,3mM	0,02 ml	c = 10
Na-Pyruvat	2,4mM	0,01 ml	c = 5,5
Plasma-Extrakt(Verd.1:10)		0,01 ml	

Start mit Na-Pyruvat

2. GDH
Glycerophosphat-Dehydrogenase

Reaktionsgleichung:

DAF + DPN-H	<u>GDH</u>	GP + DPN	
TRA-Puffer pH7,6			0,93 ml
DPN-H	0,3 mM		0,02 ml c = 10
Dihydroxyacetonphosphat	0,4 mM		0,01 ml
Plasmaextrakt (Verd.1:10)			0,04 ml

DAF wird mit einem Ionenaustauscher aufbereitet

Start mit DAF

Anstelle von DAF kann auch ein Trioseestergemisch verwendet werden.

3. MDH
Malatdehydrogenase

Reaktionsgleichung:

Oxalacetat + DPN-H	<u>MDH</u>	l-Malat + DPN	
TRA-Puffer pH7,6			1,94 ml
DPNH	0,3 mM		0,04 ml c = 10
Oxalacetat	0,2 mM		0,02 ml c = 2,6
Plasmaextrakt(Verd.1:10)			0,01 ml

Start mit Oxalacetat

Die Oxaleessigsäure darf erst unmittelbar vor dem Versuch gelöst werden, da sie in wässriger Lösung sehr instabil ist.

4. GAP-DH
Glyceroaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase

Reaktionsgleichung:

- a) 3PGS+ATP PGK/Mg⁺⁺ 1, 3di PGS+ADP(Hilfsreaktion)
- b) 1,3-di-PGS+DPN-H GAP-DH GAP+DPN+HOPO₃--

TRA-Puffer pH7,6			0,845 ml
DPNH	0,3 mM		0,02 ml c = 10
Glutathion	2,4 mM		0,02 ml c = 36,8
ATP	1,5 mM		0,05 ml c = 18
MgSO ₄	3,3 mM		0,02 ml c = 40,6
PGK	100 IE		0,005 ml
3-Phosphorglycerat(3PGS)	7,0 mM		0,02 ml c = 188
Plasmaextrakt (Verd.1:10)			0,02 ml

Start mit 3-PGS

Glutathion lösten wir jeden Tag neu.

Die Lösung wurde mit NaOH auf pH 5-6 eingestellt.

5. PGK

Phosphat-Glyceratkinase

Reaktionsgleichung:

a) $3\text{-PGS} + \text{ATP} \xrightarrow{\text{PGK/Mg}^{++}} 1,3\text{di-PGS} + \text{ADP}$

b) $1,3\text{di-PGS} + \text{DPN-H} \xrightarrow{\text{GAP-DH}} \text{GAP} + \text{DPN} + \text{HOPO}_3^{--}$ (Hilfsreaktion)

TRA-Puffer pH 7,6		0,835 ml	
DPN-H	0,3 mM	0,02 ml	c = 10
Glutathion	1,2 mM	0,01 ml	c = 36,8
ATP	1,5 mM	0,05 ml	c = 18
MgSO ₄	6,6 mM	0,04 ml	c = 40,6
GAPDH	100 IE	0,05 ml	
3-Phosphorglycerat	7,0 mM	0,02 ml	c = 188
Plasmaextrakt (Verd.1:10)		0,02 ml	

Start mit 3-PGS

Glutathion wie unter Nr. 4 behandelt.

6. PK

Pyruvatkinase

Reaktionsgleichung:

a) $\text{PEP} + \text{ADP} \xrightarrow{\text{PK/Mg}^{++}\text{K}^{+}} \text{BTS} + \text{ATP}$

b) $\text{BTS} + \text{DPNH} \xrightarrow{\text{LDH}} \text{Laktat} + \text{DPN}$ (Hilfsreaktion)

KPO ₄ -Puffer pH 7,3		0,915 ml	
DPN-H	0,3 mM	0,02 ml	c = 10
ADP	2,5 mM	0,01 ml	c = 62
MgSO ₄	8,0 mM	0,02 ml	c = 197
KCl	7,5 mM	0,02 ml	c = 281
LDH (Verdünnung 1:10)	40 IE	0,005 ml	
PEP	0,8 mM	0,01 ml	c = 37,2
Plasmaextrakt(unverd.)		0,01 ml	

Start mit PEP

7. ALD

Aldolase (Fruktose-A)

Reaktionsgleichung:

a) $\text{F-1,6-diphosphat} \xrightarrow{\text{ALD}} \text{GAP} + \text{DAP}$

b) $\text{GAP} \xrightarrow{\text{TIM}} \text{DAP}$ (1.Hilfsreaktion)

c) $2 \text{ DAP} + 2 \text{ DPN-H} \xrightarrow{\text{GDH}} 2 \text{ -GP} + \text{DPN}$ (2.Hilfsreaktion)

TRA-Puffer pH 7,6		0,89 ml	
DPN-H	0,3 mM	0,02 ml	c = 10
TIM	40 IE	0,002 ml	
GDH	40 IE	0,002 ml	
Fr.-1,6-diphosphat(FDP)	4,0 mM	0,01 ml	
Plasmaextrakt(unverd.)		0,02 ml	

Start, mit Extrakt

8. GOT

Glutamat-Oxalacetat-Transaminase

Reaktionsgleichung:

a) α -KGS+L(+)-Aspartat $\xrightarrow{\text{GOT}}$ Glutamat+Oxalacetat

b) Oxalacetat+DPN-H $\xrightarrow{\text{MDH}}$ Malat+DPN

K-PO-Puffer pH7,2	100	mM	0,918	ml	
DPN-H	0,3	mM	0,02	ml	c = 10
Aspartat	10,0	mM	0,02	ml	c = 65
MDH	40	IE	0,002	ml	
α -KGS	10	mM	0,02	ml	c = 73
Plasmaextrakt (Verd.1:10)			0,02	ml	
Start mit α -KGS					

9. GPT

Glutamat-Pyruvat-Transaminase

Reaktionsgleichung:

a) α - KGS+L-Alanin $\xrightarrow{\text{GPT}}$ BTS+Glutamat

b) BTS+DPN-H $\xrightarrow{\text{LDH}}$ Malat+DPN (Hilfsreaktion)

K-PO-Puffer pH7,2	100	mM	0,915	ml	
DPN-H	0,3	mM	0,02	ml	c = 10
L-Alanin	10,0	mM	0,02		
LDH	40	IE	0,005	ml	
α -KGS	10,0	mM	0,02	ml	c = 73
Plasmaextrakt (unverd.)			0,02	ml	
Start mit α -KGS					

b) TPN-abhängige Enzyme

1. G-6-PDH (ZF)

Glucose 6-phosphat-Dehydrogenase (Zwischenferment)

Reaktionsgleichung:

G-6P+TPN $\xrightarrow{\text{ZF}}$ 6-Phosphorgluconat+TPN-H

TRA-Puffer pH 7,6			0,89	ml	
TPN	0,4	mM	0,05	ml	c = 6
Glucose-6-phosphat	2,0	mM	0,01	ml	c = 61
Plasmaextrakt & unverd.)			0,05	ml	

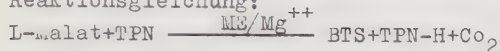
Start mit Glucose-6-phosphat

Zugabe von Mg^{++} veränderte die Reaktionsgeschwindigkeit nicht.

2. ME

Malic enzyme

Reaktionsgleichung:

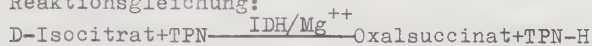


TRA-Puffer		0,92	ml	
TPN	0,2 mM	0,025	ml	c = 6
MgSO ₄	8,0 mM	0,01	ml	c = 197
L-Malat	1,0 mM	0,02	ml	c = 6,7
Plasmaextrakt (unverd.)		0,025	ml	
Start mit L-Malat				

3. IDH

Isocitrat-Dehydrogenase

Reaktionsgleichung:



TRA-Puffer pH 7,6		0,87	ml	
TPN	0,4 mM	0,05	ml	c = 6
MgSO ₄	8,0 mM	0,01	ml	c = 197
D-L- ⁴ Isocitrat	1,3 mM	0,02	ml	c = 11,5 (D-IC) oder c = 23 (D-L-IC)

Start mit Isocitrat

c) TPNH-oxydase

TRA-Puffer pH 7,6	200 mM	1,5	ml	
TPN-H	0,27 mM	0,1	ml	c = 4
Mikrosomenextrakt				
(Aufbereitung wie oben beschrieben)		0,4	ml	

Bei Verwendung von TRIS-Puffer und Phosphatpuffer ergaben sich keine Veränderungen in der Reaktionsgeschwindigkeit.

Bei Versuchen mit dem gesamten 10 000-G-Überstand (Mikrosomen und Plasma) waren die Ergebnisse unbefriedigend. Die Reaktionen verliefen nicht linear, und die Schwankungsbreite war beträchtlich. Außerdem beobachteten wir eine sonst nicht auftretende Substrathemmung.

Eine besondere Wärmeempfindlichkeit oder Instabilität wurde nicht festgestellt.

d) α -GP-Ox
 α -Glycerophosphatoxydase

K-Na-PO ₄ -Puffer pH 7,2	100 mM	0,84 ml
KCN	1 mM	0,02 ml c = 3,25
MgSO ₄	8 mM	0,01 ml c = 197
Cytochrom C		0,04 ml 2,6%ige wässr. Lösung
Mitochondrienextrakt (Aufbereitung wie vorher beschrieben)		0,05 ml
D-L- α -GP	40 mM	0,04 ml c = 315
Start mit α -GP		

Dieses Enzym ist sehr wärmeempfindlich. Bei der Aufbereitung ist gute Kühlung erforderlich.

Berechnung der Enzymaktivität

Die mit Hilfe des TE-Wandlers aufgezeichneten linearen Extinktionsänderungen wurden mit Hilfe eines Ableselineals, das die Extinktionsänderung in 5 Minuten anzeigte, ausgewertet. Aus den so ermittelten Extinktionsänderungen pro Zeiteinheit wurde unter Berücksichtigung des Verdünnungsfaktors und des Extinktionskoeffizienten von DPN und TPN bzw. Cytochrom C die Enzymaktivität als internationale Einheit pro Gramm Frischgewicht berechnet. Eine internationale Einheit = 1μ Mol Substanzumsatz pro Minute und Gramm. Die allgemeine Formel für die Berechnung lautet demnach bei Messung Eppendorf bei 366 $m\mu$

ΔE /pro Minute x Verdünnungsfaktor : 6,2 bei der Bestimmung der GP-Ox ΔE pro Minute x Verdünnungsfaktor : (9,3 x 2). Auch die spezifische Aktivität wurde bestimmt als internationale Einheit pro g:mg Protein. Es wurde der Quotient aus Aktivität (in Enzymeinheiten) pro Gramm Frischgewicht und dem Proteingehalt des Präparates (in mg) berechnet. Die Enzymgehalte pro Gesamtleber bezogen wir auf die Leber einer "Standardmaus" von 25 g Gewicht. Weiterhin berechneten wir die prozentuale Abweichung der Versuchsergebnisse von den jeweiligen Tageskontrollen.

V Bestimmung des Proteins

Wir bestimmten den Proteingehalt im Gesamtextrakt, im Plasma-
überstand, im Extrakt zur Bestimmung der α -GP-Ox und in den
Mikrosomen nach der Buret-Methode (Weichselbaum 1946 in der
Modifikation nach Bücher, Beisenherz et al. 1963). Es wurde
mit 10 ml-Zentrifugenröhrchen gearbeitet. Wir füllten das Ei-
weiß unter Schütteln mit 0,3 ml einer 3-molaren Trichloressig-
säure aus. Danach wurde mit aqua dest. nachgespült, um die am
Rande hängenden Teilchen mit herunterzubringen. Wir füllten
bis auf 2 ml auf, anschließend wurde 10 Minuten bei 4000 Um-
drehungen pro Minute zentrifugiert. Der Bodensatz wurde in 5 ml
Biuretreagenz gelöst. Um eine Verfälschung der Ergebnisse durch
unspezifische Trübungen, die sich besonders bei der Verwendung
von Mikrosomen nicht ganz vermeiden lassen, auszuschließen,
wurde die spezifische Biuretfärbung nach Ermittlung der Ex-
tinktion durch Cyanid gelöscht und die verbleibende unspezi-
fische Extinktion abgezogen. (Klingenberg 1954) Die Messung
erfolgte bei einer Wellenlänge von $546 m\mu$ in einer 20 mm lan-
gen Küvette im Eppendorphotometer. Als Umrechnungsfaktor
zur Ermittlung der Proteingehalte wurde 10,5 eingesetzt.

VI Statistische Auswertung

Die Signifikanz wurde auf Grund t-Verteilung nach Student
unter Verwendung der Geigytabellen ermittelt. Die Werte für
P und die Signifikanzgrenze werden in den einzelnen Tabellen
angegeben.

C Experimenteller Teil

II Beziehung zwischen induzierter Lebervergrößerung und der Aktivierung mikrosomaler Enzyme

Die Vergrößerung der Leber nach chronischer Einwirkung von Fremdstoffen kann, wie einleitend erwähnt wurde, auf drei Mechanismen beruhen.

1. Die Organzunahme ist Ausdruck einer isolierten und quantitativ äquivalenten Vermehrung endoplasmatischer Strukturen.
 2. An der Lebervergrößerung ist außer der Mikrosomenvermehrung eine Vergrößerung nicht mikrosomaler Enzyme beteiligt, die notwendig sind für die Neusynthese die Erhaltung und die erhöhte Funktion der vermehrten endoplasmatischen Strukturen.
 3. Die Lebervergrößerung beruht auf einer proportionierten Vermehrung aller Zellanteile, also auf normalem Organwachstum.
- Durch Untersuchung einer Reihe von unterschiedlich stark lebervergrößernden Pharmaka prüften wir, ob eine qualitative Übereinstimmung zwischen Lebervergrößerung und Mikrosomenaktivierung besteht und ob eine annähernd quantitative Parallele nachzuweisen ist. Eine sichere quantitative Beurteilung der Mikrosomenaktivierung ist problematisch, die elektronenoptischen Untersuchungen erlauben nur eine grobe Abschätzung. Pharmakologische Aktivitätsbestimmungen wie Ermittlung der Evipanschlaflzeit der Krampfschwelle etc. besitzen wegen der Vielzahl und der unterschiedlichen Aktivierungsgröße der einzelnen Metabolisierungsenzyme nur beschränkte Aussagekraft. Das Gleiche gilt für die Bestimmung der spezifischen Einzelenzyme wie Esterasen, Hydroxylasen und Reduktasen, die hinsichtlich des Aktivierungsgrades bei den verschiedenen induzierenden Substanzen sehr große Unterschiede aufweisen. Es schien deshalb sinnvoll, als Maß einer Mikrosomenaktivierung nicht Einzelenzyme und Funktionen zu bestimmen, sondern die Aktivität der TPNH-Oxydase. Sie stellt nach Untersuchungen von Gillette und Brodie das allen Abbaureaktionen gemeinsame Enzym dar (Gillette, Brodie 1957) und steht am Anfang der Reaktionsketten (Estabrook).

Die Ergebnisse der Versuchsreihe sind in Abbildung 1 in Form eines Säulendiagrammes dargestellt.

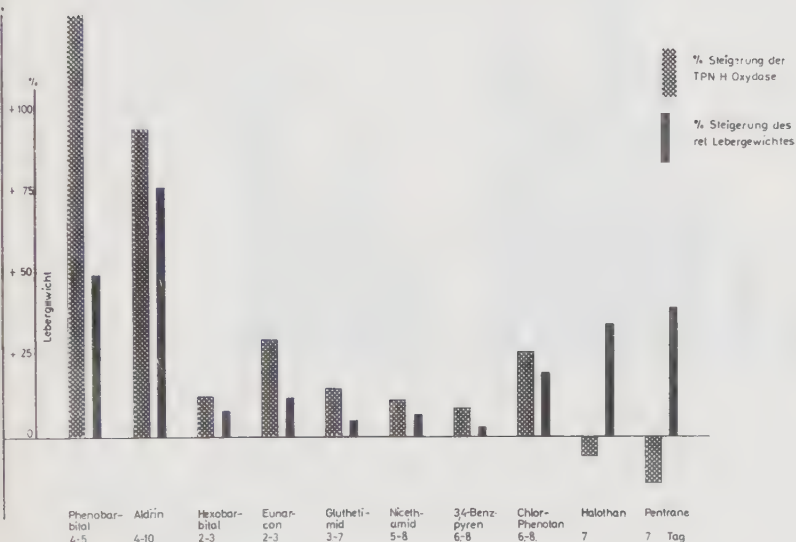


Abbildung 1: Vergleich von TPNH-Oxydase-Aktivierung und Lebervergrößerung bei chronischer Einwirkung von Pharmaka mit verschieden starker Wirksamkeit.

Es ist offensichtlich, daß eine Parallele zwischen dem Anstieg der TPNH-Oxydase und der Lebervergrößerung besteht. Das gilt sowohl hinsichtlich des zeitlichen Verlaufs (Abb.2) als auch der quantitativen Abstufung bei stark unterschiedlich wirksamen Substanzen (Tab.1) und bei Applikationen verschieden großer Dosen eines Präparats. (Tab. 2 und 3)

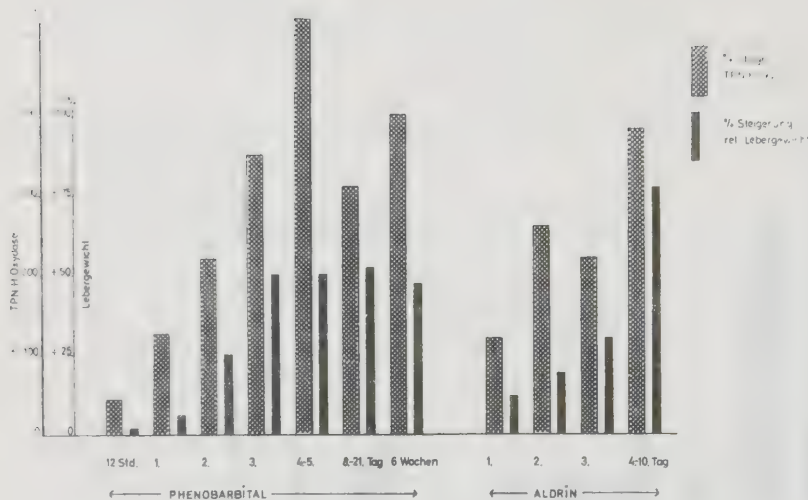


Abbildung 2: Zeitlicher Verlauf von TPNH-Oxydase-Aktivierung und Lebervergrößerung bei Applikation von Phenobarbital (150 mg pro kg) und Aldrin (10 mg pro kg).

Bei den Substanzen, die eine starke Lebervergrößerung verursachen wie Luminal und Aldrin beginnt eine Aktivierung der TPNH-Oxydase früher und ist prozentual erheblich stärker ausgeprägt als bei den Substanzen, die keine oder nur eine geringe Lebervergrößerung induzieren. Umgekehrt sieht man, daß eine signifikante Vergrößerung der Leber nur bei den Substanzen auftritt, die eine Erhöhung der TPNH-Oxydaseaktivität von über 100% verursachen. Nicht in den Rahmen dieser gesetzmäßigen Beziehung lassen sich die Halogenkohlenwasserstoffe Halothan und Penthran einfügen. Trotz verminderter TPNH-Oxydaseaktivität bewirken sie eine beträchtliche Lebervergrößerung (Tab.1).

Hier muß demnach ein vollkommen anderer Mechanismus angenommen werden. Bei den cyclischen Halogenkohlenwasserstoffen Aldrin und Chlorphenothan wird die TPNH-Oxydase zwar stark aktiviert, die Zunahme des relativen Lebergewichtes ist aber stärker als nach dem Anstieg der TPNH-Oxydaseaktivität zu erwarten wäre. Bei Aldrin vergrößert sich die Leber so stark, wie es bisher nur bei einer Kombination von Luminal und Halothan beobachtet wurde. Das legt die Vermutung nahe, daß hier eine Kombination beider Mechanismen vorliegen könnte.

Zusammenfassend haben die Versuche gezeigt, daß mit Ausnahme der Gasnarkotika Halothan und Penthran bei allen Substanzen eine sichere Beziehung zwischen der Aktivierung der TPNH-Oxydase und der Lebervergrößerung besteht. Die Ergebnisse lassen jedoch keine Aussage darüber zu, ob die Organgewichtszunahme nur auf der Vermehrung der Mikrosomalstrukturen beruht oder ob die Endoplasmaaktivierung nur ein Glied der Kausalkette ist, die zu der Lebervergrößerung führt. Um diese Frage beurteilen zu können, bestimmten wir zunächst in einigen Serien dieser Versuchsreihe die absolute Zunahme der Mikrosomproteingehalte in der Gesamtleber der Tiere (Tabelle 4). Die Tabelle zeigt, daß vor allem bei den stark induzierenden Substanzen, wie bereits von Remmer beschrieben (Remmer 1962) der Proteingehalt der Mikrosomenfraktionen deutlich ansteigt. Auch unter Berücksichtigung des beträchtlichen Lipoidgehaltes der Mikrosomen ist es jedoch ganz unmöglich, die Lebervergrößerung allein auf die Zunahme der endoplasmatischen Organellen zurückzuführen. Die erste der einleitend diskutierten Ursachen der Leberhypertrophie kann daher ausgeschieden werden. Zur Prüfung der beiden anderen Hypothesen bestimmten wir den Verlauf der extramikrosomalen Enzymgehalte während der Vergrößerungsphase.

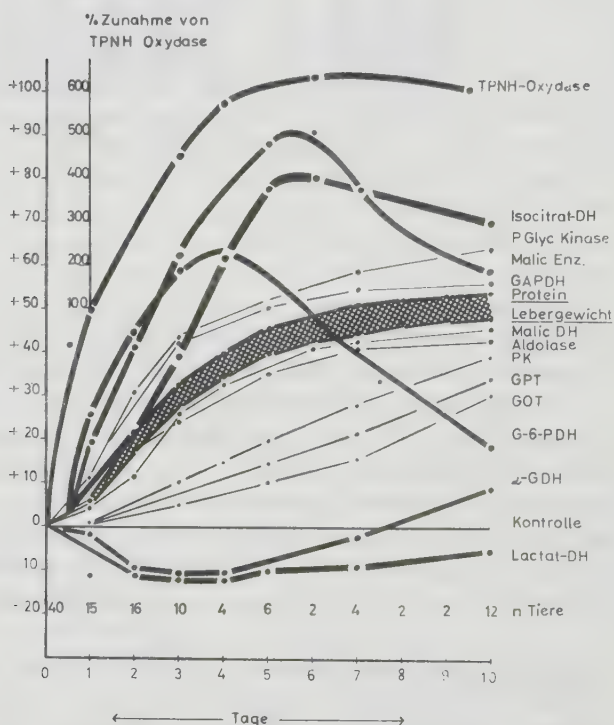
II Der Verlauf extramikrosomaler Enzymgehalte während der Lebervergrößerung

Wir untersuchten zunächst den genauen zeitlichen Verlauf der Aktivitäten extramikrosomaler Enzyme vom Beginn der Applikation bis zum Abschluß der Wachstumsphase bei den besonders stark wirksamen Substanzen Phenobarbital und Aldrin und bei den stark wachstumsinduzierenden chlorierten aliphatischen

Kohlenwasserstoffen Halothan und Penthran. Für die Tests wurden Enzyme ausgewählt, die wesentliche cytoplasmatische und mitochondriale Funktionen kennzeichnen. Da zu entscheiden war, ob eine dem Proteinzuwachs parallel laufende proportionierte Synthese aller Enzyme erfolgt, wurde der Verlauf der Gesamtgenalte im Vergleich mit Gewichts- und Proteinzunahme der Leber ermittelt.

1. Wirkung von Phenobarbital

Abb.3



zu Abb.3: Verlauf der Enzymgehalte der Gesamtleber bei chronischer Applikation von 150 mg pro kg Phenobarbital täglich im Trinkwasser. Die Enzymgehalte wurden auf die Leber eines 25 g schweren Tieres bezogen. Angabe in prozentualer Veränderung zu gleichzeitig untersuchten Kontrolltieren.

Abb. 3 gibt den Verlauf der Gesamtenzymgehalte während der Phase des durch Phenobarbital induzierten Leberwachstums wieder. Die der Abbildung zugrunde liegenden Absolutwerte sind in den Tabellen 5 und 6 angeführt. Es lassen sich hier drei charakteristische Verlaufstypen klar differenzieren.

a) Eine Enzymgruppe steigt schon zu Beginn der Wachstumsphase steil an und sinkt nach Abschluß des stärksten Wachstumsanstieges wieder auf normale Werte zurück. Zu dieser Gruppe gehören Glukose-6-Phosphatdehydrogenase, malic enzyme und in geringerem Maße die TPN-abhängige Isocitratdehydrogenase. Die in Abb.4 in üblicher Weise als i.E. pro Gramm Frischgewicht angegebenen Enzymaktivitäten sind daher zunächst erhöht und kehren dann wieder in den Normbereich zurück. Beim Zwischenferment sinkt die Aktivität sogar leicht ab. Die Zahlenwerte befinden sich in Tabelle 7 und 8.

b) Die zweite und umfangreichste Gruppe steigt mit verschiedenen großen Abweichungen annähernd parallel zur Proteinzunahme und zur Lebervergrößerung an. Zu dieser Gruppe gehören die wesentlichsten Enzyme der Embden-Meierhof-Kette. Die beiden Transaminasen GOT und GPT und die Pyruvatkinase steigen am Anfang sehr langsam an, liegen aber am Ende der Wachstumsperiode nur wenig unter dem Bereich der synkron ansteigenden Enzyme. Die spezifischen Enzymaktivitäten dieser Gruppe bleiben meist im Normbereich und sind am Ende durchweg normal.

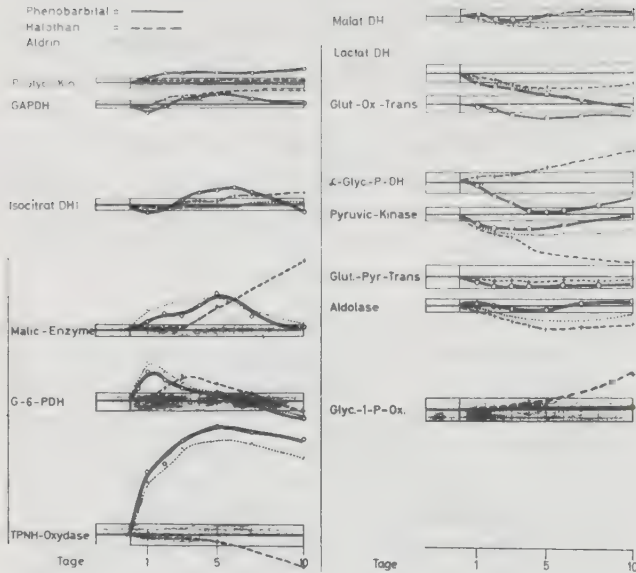


Abb.4: Beeinflussung der Enzymaktivitäten (IE/g Frischgewicht) bei chronischer Zufuhr von 150 mg pro kg Phenobarbital bzw. 10 mg pro kg Aldrin oder 1% Halothan.

c) Bei einer dritten Gruppe, zu der die LDH und die α -GDH gehören, sinken die spezifischen Aktivitäten schon zu Beginn der Wachstumsphase steil ab. Aus Abb.2 geht hervor, daß die Gesamtgehalte der Leber dabei annähernd unverändert bleiben. Beide Enzyme erfahren also keine Verminderung durch Zerstörung oder Austritt ins Plasma, sondern werden nicht mitsynthetisiert und infolgedessen durch die Zunahme der Zellproteingehalte verdünnt. Eine Synthese setzt erst am Ende der Wachstumsperiode ein, die Enzymkonzentrationen steigen langsam an, liegen aber noch deutlich unter den Normalwerten. Am Ende der

Wachstumsphase sind demnach die Gehalte aller geprüften Enzyme erhöht. Die Gehaltszunahmen entsprechen jedoch nur zum Teil dem Proteinzuwachs, es bestehen also noch nicht die physiologischen Proportionen. Die Verläufe lassen jedoch eine Tendenz zur Wiedernerstellung der normalen Enzymmuster in der vergrößerten Leber erkennen.

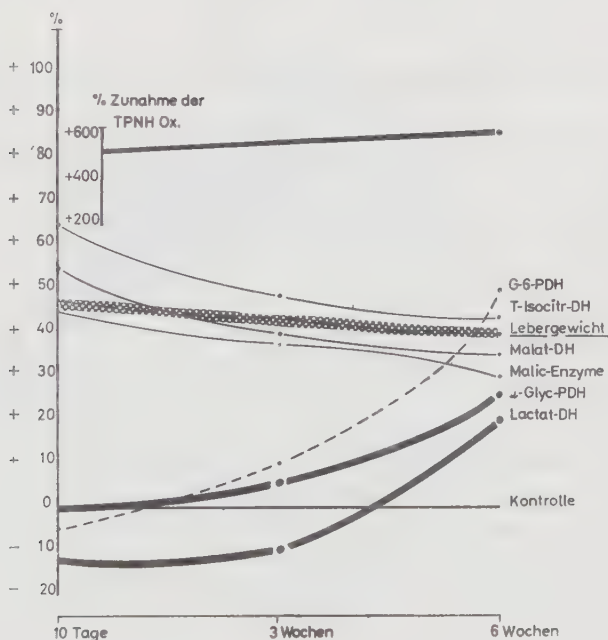


Abb.5: Verlauf der Enzymgehalte der Leber bei chronischer Phenobarbitaleinwirkung nach Erreichen der maximalen Lebervergrößerung. Berechnung und Größenangaben wie in Abb.3

Weil die Frage einer proportionierten oder unproportionierten Enzymvermehrung sehr wesentlich für die Beurteilung des Charakters der Lebervergrößerung war, prüften wir die Verläufe der am 10. Tag noch nicht im Normalbereich liegenden Enzyme in der darauf folgenden Phase der Organgewichtskonstanz weiter. Abb. 5 zeigt, daß sich die angedeutete Tendenz fortsetzt. Nach sechswöchentlicher Phenobarbitalzufuhr liegen die Enzymkonzentrationen im Normbereich (siehe Tabelle). Die um 40% vergrößerte Leber besitzt demnach ein nahezu normales Enzymspektrum. Als Ausdruck der weiterbestehenden Mikrosomenaktivierung findet sich als einzige spezifische Veränderung eine bleibende Erhöhung der TPNH-Oxydase von etwa 500%.

2. Die Wirkung nicht induzierender Halogenkohlenwasserstoffe

Die Narkotika Halothan und Penthran bewirken bei chronischer Applikation eine sehr beträchtliche Lebervergrößerung. Die TPNH-Oxydase wird dabei nicht aktiviert, sondern durch Halothan wenig, durch Penthran um etwa bis 50% gehemmt. Die Lebervergrößerung steht demnach hier nicht im Zusammenhang mit der Mikrosomenvermehrung, sondern muß auf einem völlig anderen Mechanismus beruhen. Das Verhalten der Enzymaktivitäten während der durch Halothan ausgelösten Lebervergrößerung wurde in gemeinsamen Untersuchungen mit Schimassek und Gallwitz eingehend geprüft (Schimassek, Kunz, Gallwitz 1965). Abb. 6 gibt die Veränderungen der Gesamtgenalte wider. Es zeigen sich hier bei dem größten Teil der Enzyme Verläufe, die denen bei der Phenobarbitalvergrößerung entsprechen. Das gilt insbesondere für die Glukose-6-Phosphatdehydrogenase, für die Embden-Meierhof-Enzyme und für die Lactatdehydrogenase. Abweichende Verläufe finden sich bei der TPNH-Oxydase, deren Aktivität absinkt und bei den Enzymen des Glycerophosphatzyklus α -GDH und α -GP-Ox, deren Aktivität hier außerordentlich erhöht ist. Besonders charakteristisch ist eine sehr starke und im Gegensatz zu Phenobarbital anhaltende Aktivierung des malic enzyme. Um festzustellen, ob diese spezifischen Enzymveränderungen von genereller Bedeutung für die Lebervergrößerung durch nichtinduzierende

Pharmaka ist, bestimmten wir das Verhalten dieser spezifisch veränderten Enzyme auch bei Penthran.

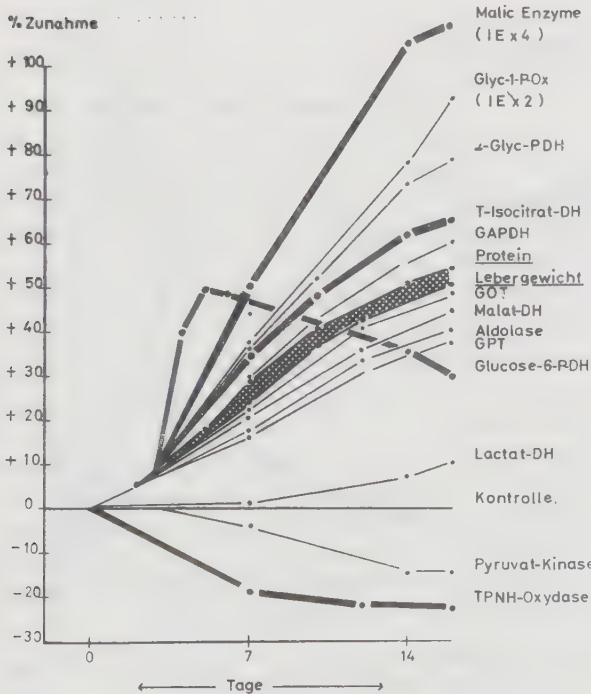


Abb.6: Veränderung der Enzymgehalte der Gesamtleber 25 g schwerer Mäuse bei chronischer Applikation von 1% Halothan täglich 1 Stunde. Berechnung und Größenangabe wie in Abb. 3 und 5.

Zur exakten Vergleichbarkeit wurden in der gleichen Serie die spezifisch interessierenden Veränderungen bei Halothan mitgeprüft. Die in der Tabelle zusammengestellten Resultate zeigen ähnliche Veränderungen der TPNH-Oxydase und der LDH. Das malic enzyme ist erhöht, aber nicht in dem extremen Maß wie bei Halothan. Die Aktivität der α -GP-Ox ist im Gegensatz zu Halothan unverändert.

3. Die Wirkung von Aldrin

Das Insektizid Aldrin ruft bei längerer Applikation eine Lebervergrößerung in einem Ausmaß hervor, wie sie sonst nur bei einer Kombination von Luminal und Halothan beobachtet wurde. Die Relation von Mikrosomenaktivierung und Lebervergrößerung und die Veränderungen der Nucleinsäuregehalte ließen an die Möglichkeit denken, daß hier eine Kombination beider Mechanismen in einer Substanz vorliegt. Diese Annahme wurde unterstützt durch die elektronenmikroskopisch erkennbaren Veränderungen, die sowohl eine Vermehrung der smooth-membranes wie beim Phenobarbital als auch eine Veränderung der Mitochondrien wie bei Halothan erkennen ließen. Auch die chemische Konstitution läßt eine Wirkung über beide Mechanismen durchaus denkbar erscheinen. Die Veränderungen der Enzymgehalte der Gesamtleber sind in Abb. 7 dargestellt. Entgegen unserer Erwartungen entsprachen die Enzymveränderungen in allen Details den bei Phenobarbital beobachteten Verläufen. Eine Steigerung der Enzyme des Glycero-phosphatzyklus konnte nicht nachgewiesen werden.

Die der Abbildung zu Grunde liegenden Absolutwerte und die Veränderungen der Enzymkonzentrationen IE/g sind in den Tabellen 9, 10, 11 und 12 angegeben.

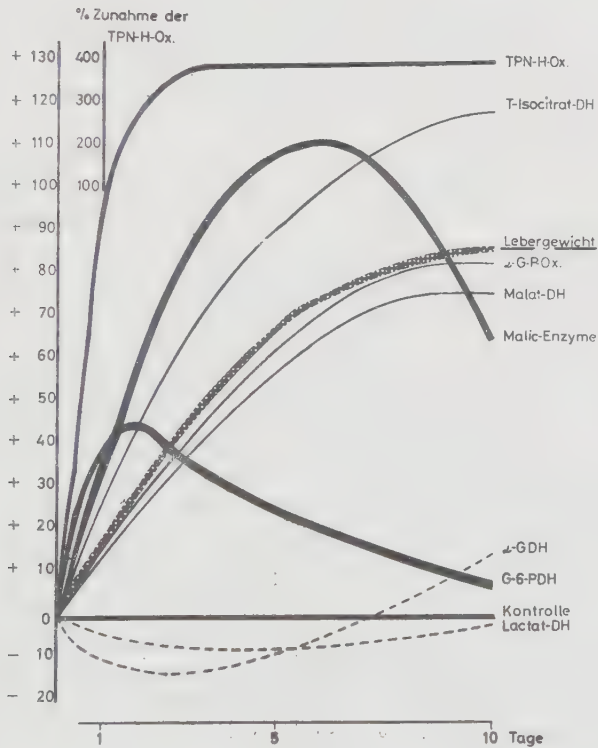


Abb.7: Veränderung der Enzymgehalte der Gesamtleber 25 g schwerer Mäuse bei chronischer Applikation von Aldrin (10 mg pro kg täglich).

Berechnung und Größenangaben wie in Abb.3, 5 und 6.

III Veränderung der Metabolitgehalte während der durch Phenobarbital induzierten Lebervergrößerung

Zur Deutung der differenten Verläufe der Enzymgehalte während der Wachstumsphase wurde bei den phenobarbitalbehandelten Tieren die Spiegel der interessierenden Metabolite in der Leber mitbestimmt. Viele der analysierten Metaboliten hatten während des Untersuchungszeitraumes von 15 Tagen keine sich kontinuierlich in gleicher Richtung entwickelnden Verläufe, sondern zeigten in verschiedenen Phasen der Phenobarbitalwirkung teilweise entgegengesetzte Veränderungen. Es ließen sich deutlich drei Kurvenabschnitte abgrenzen: 1. initial auftretende Veränderungen, 2. die z.T. in entgegengesetzte Richtung tendierenden Verschiebungen während des steilen Schenkels der Wachstumsphase und 3. die darauf folgenden Veränderungen in der Phase der Organgewichtskonstanz nach Erreichen des erhöhten Gewichtsniveaus. (Tabelle 13) Die Metabolitveränderungen waren größtenteils völlig verschieden von denen, die während der Lebervergrößerung durch Halothan gefunden wurden (Schimassek 1965). Die Glykogengehalte sanken während der Wachstumsphase stark ab und waren in der vergrößerten Leber wieder normal; das galt in gleichem Maße für Lyo- und Desmoglykogen. Da die Fruktosediphosphatgehalte annähernd reziprok laufend erhöht sind, kann daraus auf eine gesteigerte Glykolyse in dieser Phase geschlossen werden. Die Glukose-6-Phosphatgehalte waren entsprechend der Steigerung des Pentosephosphat-shunts erniedrigt. Von Bedeutung für die Beurteilung der ausbleibenden Synthese von LDH und GDH ist die Tatsache, daß die Substrate dieser Enzyme Pyruvat und Dihydroxyacetonphosphat weder in der initialen noch in der Wachstumsphase erniedrigt waren, sondern im Gegenteil anstiegen, bei Pyruvat sogar vorübergehend um 100%. Die Phosphoenolpyruvatgehalte waren gleichfalls erhöht. Die Lactat- und Glycerophosphatgehalte waren dabei normal bis gering, aber statistisch nicht sicher erhöht. Auffallend war ein starker Abfall von Malat bis auf die Hälfte der Normalwerte. Die Metabolite des Citratzyklus, α -Ketoglutarat, Isocitrat, Citrat und Oxalacetat waren in wechselndem Ausmaß gering erhöht.

Von größter Bedeutung für die Kenntnis der zur Lebervergrößerung führenden Mechanismen waren die ausgeprägten Veränderungen der die Redoxlage des Cytoplasmaraumes kennzeichnenden Metabolitquotienten; sowohl die Lactat/Pyruvat wie die Glycerophosphat/Dihydroxyacetonphosphat und Malat/Oxalacetat-Quotienten waren statistisch sicher erniedrigt. Die aus diesen Werten zu schließende Positivierung der DPN-Redoxlage wurde auch bei Analysen der stationären Pyridinnucleotidgehalte gefunden (Bosch 1966).

D Diskussion

Aufgabe der vorliegenden Arbeit war es, durch die Analyse der Enzymmuster Hinweise auf das Wesen der pharmakainduzierten Lebervergrößerung zu erhalten. Wie einleitend diskutiert, waren drei ursächliche Mechanismen denkbar:

1. Die Lebervergrößerung ist Ausdruck einerisierten Vermehrung des mikrosomalen Metabolisierungsapparates.
2. Für die Organvergrößerung ist neben der Mikrosomenvermehrung eine Vergrößerung spezifischer extramikrosomaler Enzymsysteme verantwortlich, die für die Neusynthese, Strukturserhaltung und für die gesteigerte Funktion des vergrößerten Metabolisierungssystems erforderlich sind.
3. Die Lebervergrößerung beruht auf echtem koordiniertem Organwachstum durch Eingriff der Pharmaka, ihrer Metabolite oder der durch ihren Umbau ausgelösten Stoffwechselreaktionen in spezifische, das Zellwachstum steuernde Reaktionssysteme.

Wesentliches Ergebnis unserer Untersuchungen ist der sichere Nachweis, daß die Lebervergrößerung in keinem Fall auf einer alleinigen Vermehrung endoplasmatischer Strukturen beruhen kann. Bei dem überwiegenden Teil der Pharmaka findet sich zwar als primäre Wirkung eine Aktivierung der mikrosomalen TPNH-Oxydase, die hinsichtlich des quantitativen Ausmaßes bei unterschiedlich aktiven Pharmaka oder bei verschiedenen großen Dosen der gleichen Substanz eine eindeutige Parallele zu dem Ausmaß

der dabei auftretenden Lebervergrößerung zeigt. Hier kann nach allen experimentellen Daten ein Kausalzusammenhang sicher angenommen werden. Von dieser Gruppe der mikrosomeninduzierenden Fremdstoffe läßt sich jedoch eine zweite Gruppe stark lebervergrößernder Pharmaka abgrenzen, die die Aktivität der mikrosomalen TPNH-Oxydase vermindern und die Metabolisierung und Funktion der Mikrosomen hemmen.

Bei beiden Gruppen konnte schon von Beginn der Wachstumsphase an ein Anstieg extramikrosomaler Enzyme nachgewiesen werden. Bei dem überwiegenden Teil der untersuchten Enzyme stiegen die Gesamtgehalte in der Leber parallel zur Vergrößerung des Organgewichtes und zur Zunahme der Proteingehalte an. Zu dieser Enzymgruppe gehörten sowohl bei Halothan als auch bei Phenobarbital, den beiden am stärksten wachstumswirksamen Vertretern der zwei different wirkenden Substanzreihen, vor allem die Enzyme der Meierhof-Kette und abgesehen von einem Zurückbleiben in den ersten Tagen auch die Transaminasen. Im Gegensatz zu diesen proportioniert anwachsenden Enzymen wurden bei beiden Hypertrophietypen bei einer kleinen Enzymgruppe spezifische Aktivitätsänderungen gefunden. Bei allen untersuchten Substanzen trat eine initiale Aktivitätssteigerung der G6-PDH, des malic enzyme und weniger ausgeprägt und etwas später der TPN-IDH auf. Im Gegensatz dazu war die Aktivität der Lactatdehydrogenase und bei Phenobarbital auch die der GDH erniedrigt. Da die Gesamtgehalte annähernd gleich blieben, muß hier als Ursache das Ausbleiben einer Neusynthese angenommen werden. Die Aktivitätsänderungen dieser Enzyme bildeten sich nach Abschluß der Wachstumsphase wieder zurück. Die vergrößerte Leber tendierte nach Erreichen des neuen Niveaus zu einem normalen Enzymmuster. In der Phenobarbitalleber lagen die Enzymgehalte 6 Wochen nach Beginn der Pharmakazufuhr wieder im Bereich der Norm. Es ist deshalb eine naheliegende Vermutung, daß diese vorübergehenden und bei beiden Typen mit der steilen Phase der Lebervergrößerung verbundenen Enzymveränderungen Ausdruck des physiologischen Wachstumsstoffwechsels sind. Das ist bei der G6-PDH auf Grund ihrer Bedeutung für die Nucleotidsynthese,

beim malic enzyme als einem wesentlichen Enzym der CO_2 -Fixierung bei Fettsäure- und Proteinsynthese und bei der IDH als Hauptenzym zur Bildung von IPNH für zelluläre Biosynthesen durchaus denkbar. Während des physiologischen Leberwachstums beobachteten wir gleichsinnige Aktivitätsunterschiede dieser Enzyme. (Tabelle 14)

Schwieriger zu deuten ist das Zurückbleiben der LDH- und GDH-Gehalte. Eine starke Erniedrigung der GDH, weniger der LDH, wurde von Bücher et al. (1959) in einer großen Zahl von Tumoren gefunden. Das scheint jedoch kein obligates Glied des Wachstumsstoffwechsels zu sein. Boxer et al. (1959) fanden in der sich regenerierenden Leber nach Teilhepatektomien normale bis erhöhte Werte. Auch während des physiologischen Wachstums der Mäuse finden sich keine wesentlichen Aktivitätsabweichungen dieser Enzyme (Tabelle 14).

Als Ursache der ausbleibenden Neusynthese bei der pharmaka-induzierten Lebervergrößerung war zu erwägen, daß die Kapazität dieser großen Enzyme für eine erhöhte metabolische Beanspruchung ausreicht. Dagegen sprach jedoch die Gehaltzunahme der anderen großen Enzyme MDH, IDH usw. Es war weiter denkbar, daß ein langsamer Turnover und eine größere Halbwertszeit eine sehr langsame Anpassung dieser Enzyme bedingt. Dagegen sprach jedoch die Feststellung Boxers (1959), daß in der regenerierenden Leber sehr schnell eine Synthese dieser Enzyme auf übernormale Werte erfolgt. Auf Grund der Metabolitanalysen kann auch in keinem Falle ein fehlender Induktionsanstoß durch den Mangel der spezifischen Substrate für das Ausbleiben der Enzymsynthese verantwortlich gemacht werden. Vor allem die Pyruvatgehalte sind in der Phenobarbitalleber signifikant erhöht. Eine mögliche Ursache könnte bei beiden Enzymen in der veränderten Redoxlage gesehen werden, die sowohl aus den Metabolitgleichgewichten wie aus den Analysen der stationären Pyridinnucleotidgehalte des Cytoplasmaraumes hervorgeht. Da eine wesentliche Funktion der LDH und GDH in der Stabilisierung der Redoxlage zu sehen ist, scheint es denkbar, daß die Enzym-induktion von diesem System gesteuert wird. Für diese Hypothese fehlen jedoch bisher noch exakte experimentelle Grundlagen.

Neben diesen in der Vergrößerungsphase veränderten und in der folgenden Gleichgewichtsphase zu normalen Proportionen zurückkehrenden Enzymen wurden bei beiden Hypertrophietypen auch in der vergrößerten Leber unverändert persistierende Aktivitätssteigerungen gefunden. Diese bleibenden Veränderungen müssen als spezifische Wirkungen der Pharmaka angesehen werden. Die spezifische Wirkung besteht bei Phenobarbital und den anderen induzierenden Substanzen in der Aktivierung der mikrosomalen Metabolisierungsenzyme, als deren Parameter von uns die TPNH-Oxydase bestimmt wurde. Die sehr ausgeprägte und andauernde Aktivierung von malic enzyme, Glycerophosphatoxydase und GDH durch Halothan ist sicher ebenfalls als spezifisch anzusehen. Eine ähnlich starke Vergrößerung der GP-Ox wurde von Hess et al. (1965) während der Applikation von Äthylparachlorphenoxyisobuttersäure (CPIB), einer Substanz, die ähnlich wie Halothan die Leber vergrößert, gesehen. Über Ursache und Bedeutung dieser spezifischen Enzymveränderungen sind vorerst keine sicheren Aussagen möglich. Es ist denkbar, daß die extreme Steigerung von malic enzyme eine Folge des unter Halothan stark veränderten Fettstoffwechsels ist. Teppermann et al. (1958/1965) haben eine Abhängigkeit der Aktivität des malic enzyme vom Fettstoffwechsel nachweisen können. Eine andere Deutung, die auch die gleichzeitig auftretende Aktivierung der Glycerophosphatenzyme berücksichtigt, läßt sich aus der Stellung dieser drei spezifisch veränderten Enzyme im Wasserstofftransport der Zelle ableiten. Wie bereits erwähnt, ist nach Bücher und Klingenberg (1958/1960) eine wesentliche Funktion der Glycerophosphatenzyme in der Übertragung von Wasserstoff aus dem cytoplasmatischen DPN-System in den Mitochondrialraum zu sehen. Von Pette (1965) wird angenommen, daß malic enzyme in Verbindung mit der mitochondrialen Malatdehydrogenase eine ähnliche Rolle im Transport von cytoplasmatischem TPNH-Wasserstoff spielt. Nach Applikation von Halothan sinkt der Sauerstoffverbrauch in Gewebeschnitten sehr stark ab (Bosch 1966), die Oxydation von Glukose, Glykolysemetaboliten und Fettsäuren durch Mitochondrien ist drastisch erniedrigt, die Decarboxylierung dieser Substrate in gleichem Umfang gehemmt. Nach Beobachtungen Klingenbergs (pers.Mitteilung) liegt die Ursache der

herabgesetzten Gewebsatmung jedoch nicht in einer verminderten Endoxydation in der Atmungskette; der Gehalt der Mitochondrien an Cytochrom a und c ist sogar erhöht und die Oxydation von Glycerophosphat und Succinat durch Mitochondrien beträchtlich gesteigert. Aus diesen experimentellen Daten kann geschlossen werden, daß die verminderte mitochondriale Oxydation in der Halothanleber auf einer Herabsetzung der mitochondrialen Wasserstoffbildung beruht. Ein derartiger Mechanismus wurde schon von Gallagher et al. (1965) als wesentlicher Effekt auch anderer halogenierter Kohlenwasserstoffe angesehen. Es ist eine einleuchtende Annahme, die Steigerung von malic enzyme und der Enzyme des Glycerophosphatzklus als einen Versuch der Zelle anzusehen, die verminderte mitochondriale Wasserstoffbildung durch ein vermehrtes Einschleusen von cytoplasmatischem Wasserstoff zu kompensieren.

Gleiche Veränderungen dieser Enzyme und der Cytochromgehalte werden durch Einwirkung von Thyroxin hervorgerufen (Lee et al. 1959, Lee et al. 1961), das ebenfalls eine Lebervergrößerung von etwa 20% bewirkt (Conney et al. 1962). Eine Reihe biochemischer Befunde sprechen jedoch gegen diese Annahme. So wird durch Thyroxin der Sauerstoffverbrauch der Leber gesteigert, und der Fettstoffwechsel zeigt ebenfalls abweichende Verhältnisse. Denkbar erscheint jedoch, daß die Aktivierung der Glycerophosphatenzyme in beiden Fällen auf einem vermehrten Bedarf an mitochondrialem Wasserstoff beruht, der im Falle von Halothan und CPB durch herabgesetzte Bildung bei Thyroxin durch vermehrten Verbrauch entsteht.

Bei beiden Pharmakagruppen können nach diesen Überlegungen die bleibenden Aktivitätssteigerungen spezifischer Enzyme mit direkten Induktionsmechanismen erklärt und als celluläre Adaptation gedeutet werden. Mit direkten Induktionsmechanismen kann jedoch schwerlich der Gehaltanstieg aller anderen Enzyme und die daraus resultierende Lebervergrößerung erklärt werden. Hier muß zwar die oben erwähnte zweite Möglichkeit in Erwägung

gezogen werden, daß die Bildung größerer Enzymketten oder ganzer subzellulärer Strukturen wie der smooth-membranes bei den Barbitalen, der Mikrobodies bei CPIB (Hess et al.) und der Mitochondrien bei Halothan einen sehr umfangreichen Syntheseparat erfordert, und daß die Lebervergrößerung eine Folge des Anstiegs dieser sekundär induzierten "Syntheseeenzyme" ist. Gegen diese Annahme spricht jedoch, daß auch nach Abschluß der Synthesephase in der vergrößerten Leber alle geprüften Enzyme annähernd die der Lebervergrößerung und dem Proteinanstieg entsprechende Gehaltszunahme zeigen; das gilt auch für Enzyme, die keine Bedeutung für Stoffsynthesen haben. Gegen die Annahme einer sekundären Vergrößerung des Syntheseparates spricht ebenfalls die Beobachtung, daß die induktive Neubildung von Enzymen und Enzymketten, wie z.B. durch starke Belastung mit Tryptophan und Thyrosin (Knox 1962), Biotin, Hydrocortison oder Glukose nach Kohlehydratmangeldiät (Shrago et al. 1963) Gewicht und Proteingehalte der Leber wenig ausgeprägt und nur vorübergehend erhöhen.

Aus den Ergebnissen kann deshalb im Hinblick auf das Wesen der pharmakainduzierten Lebervergrößerung geschlossen werden, daß das Phänomen bei beiden Substanzgruppen durch Adaptationsmechanismen der Zelle verursacht wird; im Falle von Phenobarbital, Aldrin und anderen mikrosomeninduzierenden Substanzen durch die Adaptation an eine gesteigerte Belastung der Metabolisierungssysteme, bei Halothan und CPIB durch die Adaptation an eine spezifische Stoffwechselwirkung, die die Zelle zu kompensieren versucht. Die Mechanismen über die diese spezifischen Anpassungsvorgänge, deren Ausdruck die bleibenden Enzymveränderungen sind, zu einer nahezu proportionierten Vergrößerung aller Enzyme und damit zum Organwachstum führen, sind vorerst hypothetisch. Es mag von Bedeutung sein, daß diese initialen und spezifischen Wirkungen eine gleichsinnige Veränderung der Redoxlage des cytoplasmatischen TPN-Systems zur Folge haben. Bei daraufhin durchgeführten Untersuchungen wurden in der Hemmung der TPNH-abhängigen Uracil- und Thyminreduktase (Kirchberg 1966) und in der Steigerung des Pentosephosphatshunts (Bosch 1966) erste Hinweise auf mögliche Wirkketten gefunden.

E Zusammenfassung

Mit Hilfe der optischen Tests nach Warburg und Bücher wurde im Verlauf der bei chronischer Applikation von Phenobarbital, Aldrin, Halothan und Penthran auftretenden Lebervergrößerung das Verhalten der Aktivitäten mikrosomaler mitochondrialer und cytoplasmatischer Enzyme bestimmt. Es wurden folgende Ergebnisse erhalten:

1. Bei Applikation von Phenobarbital, Aldrin und anderen mikrosomenaktivierenden Pharmaka steigt als initiale Enzymveränderung die Aktivität der mikrosomalen TPNH-Oxydase an. Zwischen der Aktivierung der TPNH-Oxydase und der Vergrößerung der Leber bestehen gesetzmäßige Beziehungen. Es konnte eine sichere Parallelität der zeitlichen Verläufe sowie eine annähernd konstante quantitative Relation bei verschiedenen aktiven Pharmaka und bei verschiedenen hohen Dosen gleicher Substanzen nachgewiesen werden.

2. Von dieser ersten mikrosomenaktivierenden Substanzgruppe ließ sich eine zweite Gruppe lebervergrößernder Pharmaka abgrenzen, die die Aktivität der TPNH-Oxydase hemmten. Zu dieser Gruppe gehören die Halogenkohlenwasserstoffe Halothan und Penthran.

3. Die Lebervergrößerung durch Verbindungen beider Gruppen geht mit einer Zunahme der Gesamtgehalte auch extramikrosomaler Enzyme einher. Der Anstieg der einzelnen Enzyme erfolgt dabei nicht gleichartig, sondern in unterschiedlichen Verlaufsformen. Es lassen sich drei Verlaufstypen differenzieren.

a) Eine größere Gruppe, die parallel zur Zunahme der Protein- gesamtgehalte ansteigt. Dazu gehören die Hauptenzyme der Emden-Meierhof-Kette und, abgesehen von einem Zurückbleiben in den ersten Tagen, auch die Transaminasen.

b) Eine zweite Enzymgruppe, deren Gehalte zu Beginn der Lebervergrößerungsphase stärker ansteigen als die Proteingehalte und deren spezifische Aktivitäten zu Beginn erhöht sind. Dazu gehören die TPN-abhängigen Enzyme G6-PDH, malic enzyme und Isocitratdehydrogenase. Nach Abschluß der Wachstumsphase sind die Gesamtgehalte dieser Enzyme nur mehr der Lebervergrößerung entsprechend erhöht; die Konzentrationen liegen demnach wieder im physiologischen Bereich.

c) Im Gegensatz dazu fallen die Aktivitäten der LDH, bei Phenobarbital und Aldrin auch der GDH zu Beginn steil ab. Da die Gesamtgehalte annähernd normal bleiben, ist die Ursache der Aktivitätsminderung nicht auf Zerstörung oder Austreten in den Extrazellulärraum, sondern auf eine ausbleibende Synthese und auf eine Verdünnung des vorhandenen Enzymbestandes während der Gesamtproteinzunahme zurückzuführen. Eine Synthese dieser Enzyme setzt sehr langsam ein, und erst nach 6 Wochen liegen sie wieder im Normbereich. Da sich die spezifischen Aktivitätsänderungen der Enzyme nach Abschluß der Wachstumsphase normalisieren, werden sie als Folge der veränderten Stoffwechsellaage während der Lebervergrößerung angesehen. Gleichgerichtete Aktivitätsveränderungen wurden bei einigen Enzymen auch in der sich vergrößernden Leber wachsender Tiere gefunden.

4. Neben der nur in der Wachstumsphase bestehenden Enzymveränderungen wurden durch beide Substanzgruppen auch bleibende Aktivitätsänderungen bei bestimmten Enzymen induziert. Diese sind als spezifische Pharmakawirkungen anzusehen. Das ist bei Phenobarbital und anderen induzierenden Substanzen die Aktivierung der mikrosomalen TPNH-Oxydase, bei Halothan und anderen Halogen-Kohlenwasserstoffen die bleibende Aktivierung von malic enzyme und den Enzymen des Glycerophosphatzyklus. Diese spezifischen Enzymaktivierungen werden als Adaptationsmechanismen der Zelle angesehen; im Falle der mikrosomenaktivierenden Pharmaka als Adaptation an eine erhöhte funktionelle Belastung,

im Falle der Halogenkohlenwasserstoffe als Adaptation an eine spezifische Stoffwechselwirkung, die die Zelle zu kompensieren versucht.

5. Aus den Ergebnissen wird zusammenfassend geschlossen, daß die nach chronischer Zufuhr von Fremdstoffen auftretende Lebervergrößerung nicht das stoffliche Äquivalent der induzierten spezifischen Enzyme und einer Vermehrung der sie tragenden Strukturen darstellt. Die vergrößerte Leber besitzt nach Abschluß der Wachstumsphase ein annähernd normales Enzymmuster. Die Leber erfährt danach im Hinblick auf die untersuchten Enzyme eine proportionierte Vergrößerung. Mögliche Mechanismen, die von der Aktivierung spezifischer Enzyme zum Wachstum der Gesamtzelle führen können, werden diskutiert.

Tabelle 1

Verzeichnis der relativen Lebergewichte und der Aktivierung der TPN - H - Oxydase bei chronischer Einwirkung von Fremdstoffen. Die prozentualen Veränderungen der TPN - H - Oxydase sind auf die Normwerte der jeweiligen Tageskontrollen bezogen.

	n	relat. Le- bergewicht	Veränd. des rel. Lebergew. in %	IE/g Leber Frisch- gewicht	IE/25g. Maus	Veränderung der Enzym- aktivitäten in %	Veränderung der Enzym- gehalte in %
Kontrolle	75	51,0 ± 0,6	0	0,086	0,110	0 ± 6,0	0 ± 8,5
Luminal 12 Std.	10	52,2 ± 1,4	+	0,180	0,137	+ 44 ± 16,6 ++	+ 45 ± 14,5 ++
Luminal 24 Std.	10	54,4 ± 2,55	+	0,210	0,385	+126 ± 31,3 +++	+132 ± 75,2
Luminal 2 Tage	8	63,9 ± 2,7	+	0,250	0,409	+220 ± 38,2 +++	+312 ± 57,7 +++
Luminal 3 Tage	8	76,8 ± 3,5	+	0,322	0,536	+351 ± 52,0 +++	+669 ± 112,0 +++
Luminal 4-5 Tage	6	76,8 ± 1,8	+	0,439	0,794	+520 ± 233,0 ++	+763 ± 276,0 +++

Fortsetzung Tabelle 1

	n	relat. Le- bergewicht	Veränd. des rel. Lebergew. in %	IE/g Leber Frischge- wicht	IE/25g. Maus	Veränderung der Enzym- aktivitäten in %	Veränderung der Enzym- gehalte in %
Luminal 8-21 Tage	13	77,5 ± 4,9	+	0,359	0,666	+ 310 ± 50,0 +++	+ 517 ± 75,0 ++++
Luminal 6 Wochen	10	73,9 ± 3,0	+	0,222	0,414	+ 400 ± 31,0 +++	+ 560 ± 60,0 +++
Evipan 2-3 Tg.	5	55,5 ± 2,4	+	0,122	0,170	+ 50 ± 18,0 +	+ 71 ± 28,0 +
Evipan 5-10 Tg.	5	53,6 ± 2,3	+	0,121	0,166	+ 19 ± 17,0	+ 31 ± 45,8
Eunarcon 2-3 Tg.	6	57,0 ± 1,6	+	0,163	0,252	+ 120 ± 43,0 +++	+ 184 ± 57,0 +++
Eunarcon 6-10 Tg.	6	60,7 ± 0,9	+	0,177	0,263	+ 80 ± 22,3 +++	+ 130 ± 35,5 +++
Doriden 3-7 Tg.	6	53,5 ± 2,2	+	0,122	0,145	+ 60 ± 36,0	+ 77 ± 23,3 ++
Coramin							

Fortsetzung

Tabelle 1

n	relat. Le- bergewicht	Veränd. des rel. Lebergew. in %	IE/g Leber Frischge- wicht	IE/25g Maus	Veränderung der Enzym- aktivitäten in %	Veränderung der Enzym- gehalte in %		
Coramin 2-3 Tg.	7	52,4 ± 2,6	+	3	0,100	0,132	+ 37 ± 18,0	+ 38 ± 16,6 +
Coramin 5-8 Tg.	5	54,5 ± 3,2	+	7	0,155	0,217	+ 45 ± 23,0	+ 75 ± 41,1
Aldrin 1 Tg.	6	57,4 ± 5,9	+	12	0,194	0,266	+119 ± 12,0 ++++	+139 ± 13,2 ++++
Aldrin 2.Tg.	6	60,7 ± 1,9	+	19	0,233	0,355	+260 ± 53,0 ++++	+329 ± 84,0 ++++
Aldrin 3.Tg.	5	66,1 ± 2,27	+	30	0,332	0,534	+220 ± 31,0 ++++	+349 ± 70,0 ++++
Aldrin 4-10 Tg.	8	90,2 ± 4,1	*	77	0,360	0,651	+380 ± 60,0 ++++	+421 ± 85,0 ++++

n	relat. Le- bergewicht	Veränd. des rel. Lebergew. in %	IE/g Leber Frischge- wicht	IE/25g Maus	Veränderung der Enzym- aktivitäten in %	Veränderung der Enzym- gehalte in %
Benzpyren 1-5 Tg.	5 53,3 ± 3,29	+	4 0,123	0,175	+ 27 ± 17,0	+ 49 ± 24,0
Benzpyren 6-8 Tg.	5 52,5 ± 1,3	+	3 0,125	0,255	+ 36 ± 22,0	+ 40 ± 23,0
DDT 1-5 Tg.	4 53,8 ± 1,55	+	5 0,120	0,136	- 2 ± 5	+ 3 ± 6,0
DDT 6-8 Tg.	6 61,2 ± 1,48	+	20 0,218	0,326	+ 106 ± 21,0 +++	+ 141 ± 23,0 +++
Haloethan 7 Tage	4 68,8 ± 5,45	+	35 0,060	0,089	- 24 ± 9 ++	+ 11 ± 13
Perthren 7 Tage	8 71,5 ± 5,4	+	40 0,021	0,042	- 58 ± 12,5 +++	- 32 ± 16,1
P	< 0,001	++++	P < 0,01	+++	P < 0,02	++
						P < 0,05

Tabelle 2

Dosisabhängigkeit von TFNH - Oxydase - Aktivierung
und Lebervergrößerung bei 14tägiger Einwirkung von
Phenobarbital

	n	Steigerung der TFNH-Oxydase- Aktivität	Relatives Lebergewicht	Steigerung des relativen Lebergewichts
10mg/kg	6	+ 21,5 %	53,7	+ 5,3 %
30mg/kg	8	+ 21 %	55,3	+ 8,4 %
60mg/kg	8	+ 71 %	71,5	+ 40,2 %
150mg/kg	10	+450 %	79,9	+ 56 %

Tabelle 3

Dosisabhängigkeit von TPNH - Oxydase - Aktivierung
und Lebervergrößerung bei 14tägiger Einwirkung von
Aldrin

n	Steigerung der TPN-H Oxydase aktivität	Relatives Lebergewicht	Steigerung des relativen Lebergewichte
0,2mg/kg 6	+ 9,6 %	51,2	0 %
0,7mg/kg 6	+65 %	54,6	+ 7,0 %
2 mg/kg 6	+196 %	60,0	+ 17,6 %
7 mg/kg 6	+331 %	84,9	+ 66,5 %
10 mg/kg 6	+403 %	98,4	+ 93,2 %

Tabelle 4

Beeinflussung des Proteingehaltes der Leber-
mikrosome bei chronischer Einwirkung von ver-
schiedensten Fremdstoffen.

	n	mg Mikroso- menprotein/ g Leber	Prozen- tuale Verände- rung zur Kontrolle	mg Mikro- somenpro- tein/25 g Maus	Prozen- tuale Verände- rung zur Kontroll
Kontrolle	30	18,5 $\pm$ 1,2	-	29,9	-
Luminal 1 Tag	11	16,0 $\pm$ 4,0	- 14 %	21,3	- 22 %
Luminal 2-5 Tage	11	20,8 $\pm$ 3,6	+ 12 %	31,7	+ 6 %
Luminal mehr als 5 Tage	10	26,2 $\pm$ 5,1	+ 42 %	48,8	+ 63 %
Aldrin 1-5 Tg.	12	18,6 $\pm$ 4,25	0 %	34,6	+ 16 %
Aldrin mehr als 5 Tage	6	32,0 $\pm$ 2,9	+ 73 %	76,1	+ 154 %
Evipan 3 Tage	2	14,0 $\pm$ 2,0	- 24 %	17,0	- 41 %
Eunarcon 3 Tage	3	21,0 $\pm$ 2,0	+ 13 %	29,0	- 3 %

Fortsetzung
Tabelle 4

	n	mg Mikrosomenprotein/ g Leber		Prozen- tuale Verände- rung zur Kontrolle	mg Mikrosomenpro- tein/25 g Maus	Prozen- tuale Verände- rung zur Kontrolle
Coramin 8 Tage	2	24,0 ± 3		+ 30 %	40,0	+ 34 %
Benzpyren 3-8 Tage	6	16,6 ± 4,6		- 13 %	22,6	- 24 %
D D T 3-8 Tg.	7	19,0 ± 1,7		+ 3 %	27,8	- 7 %

Enzymgehalte der Gesamtleber bei Einwirkung von
150 mg/kg Penobarbital Größenangaben in IE p/Ge-
samtleber einer 25 g schweren Maus.

Tabelle 5

	K	1. Tag	2. Tag	3. Tag	5.-7. Tag	9.-10. Tag	16.-21. Tag	6 Wochen
ALT	206 n = 30	207 n = 8	218 n = 9	235 n = 12	202 n = 12	207 n = 10	183 n = 8	278 n = 10
ADP	43,4 n = 30	45,6 n = 8	54,9 n = 9	40,0 n = 12	37,7 n = 12	45,4 n = 10	44,9 n = 8	55,1 n = 10
ADP	545 n = 27	544 n = 6	611 n = 6	693 n = 12	690 n = 10	878 n = 10	740 n = 8	741 n = 10
SGPT	130 n = 10	117 n = 6	126 n = 6	185 n = 8	202 n = 7	185 n = 8		
FGA	182 n = 10	202 n = 6	239 n = 6	263 n = 8	272 n = 7	319 n = 8		
PL	26,3 n = 10	22,7 n = 6	25,1 n = 6	28,8 n = 8	34,4 n = 6	42,3 n = 7		
ALD	7,01 n = 10	8,63 n = 6	7,34 n = 6	8,79 n = 8	9,25 n = 7	11,5 n = 8		
GOT	147 n = 10	151 n = 6	140 n = 6	154 n = 8	159 n = 7	178 n = 8		
GPT	10,0 n = 10	10,0 n = 6	8,8 n = 6	12,8 n = 8	10,4 n = 6	13,5 n = 8		
EF	1,60 n = 35	2,56 n = 15	2,17 n = 10	2,78 n = 11	2,17 n = 9	1,44 n = 10	1,12 n = 8	2,42 n = 10
	4,30 n = 36	6,17 n = 12	3,65 n = 10	5,40 n = 11	8,55 n = 10	5,95 n = 10	6,72 n = 8	5,71 n = 10
LDH	27,8 n = 28	28,1 n = 6	30,9 n = 9	38,3 n = 11	51,3 n = 10	48,4 n = 10	42,3 n = 8	59,2 n = 10

Tabelle 6

Beeinflussung der Enzymgehalte der
Gesamtleber bei Einwirkung von
150 mg/kg Phenobarbital/Tag.
Angaben in prozentualer Veränderung
zu den am gleichen Tage untersuchten
Kontrolltieren

P	<	0,001	+++
P	<	0,01	+++
P	<	0,02	++
P	<	0,05	+

Tabelle 6

	K	1. Tag	2. Tag	3. Tag	5.-7. Tag	9.-10. Tag	16.-21. Tag	6 Wochen
LDH	$0 \pm 3,2$ $n = 30$	-12 ± 10 $n = 8$	$+2 \pm 8$ $n = 9$	$+4 \pm 6,7$ $n = 12$	-12 ± 6 $n = 12$	$-12 \pm 7,6$ $n = 10$	$-10 \pm 4,7$ $n = 8$	$+18 \pm 5$ $n = 10$ +++
GDH	$0 \pm 4,0$ $n = 30$	$0 \pm 9,2$ $n = 8$	$-15 \pm 4,7$ $n = 9$ ++	$0 \pm 10,1$ $n = 12$	$-10 \pm 8,3$ $n = 12$	$0 \pm 7,5$ $n = 10$	$+4 \pm 4,9$ $n = 8$	$+27 \pm 5,6$ $n = 10$ ++++
MDH	$0 \pm 3,3$ $n = 27$	$0 \pm 11,5$ $n = 6$	$+12 \pm 4,5$ $n = 6$	$+37 \pm 5,7$ $n = 12$ ++++	$+31 \pm 13,1$ $n = 10$ +	$+58 \pm 9,1$ $n = 10$ ++++	$+33 \pm 10$ $n = 8$ +++	$+36 \pm 11$ $n = 10$ +++
GAPDH	$0 \pm 3,3$ $n = 10$	$-14 \pm 4,8$ $n = 6$ ++	$-1 \pm 12,6$ $n = 6$	$+45 \pm 10,5$ $n = 8$ ++++	$+59 \pm 12,5$ $n = 7$ ++++	$+45 \pm 2$ $n = 8$ ++++		
PGK	$0 \pm 3,6$ $n = 10$	$+11 \pm 13,1$ $n = 6$	$+32 \pm 6,4$ $n = 6$ ++++	$+44 \pm 7,1$ $n = 8$ ++++	$+50 \pm 5,9$ $n = 7$ ++++	$+75 \pm 5,9$ $n = 8$ ++++		
PK	$0 \pm 11,1$ $n = 10$	$-20 \pm 9,1$ $n = 6$	$-12 \pm 9,9$ $n = 6$	$+1 \pm 10,8$ $n = 8$	$+15 \pm 10,1$ $n = 6$	$+40 \pm 14,8$ $n = 7$ ++		
ALD	$0 \pm 11,4$ $n = 10$	$+24 \pm 21,6$ $n = 6$	$+5 \pm 10,2$ $n = 6$	$+25 \pm 8,2$ $n = 8$	$+32 \pm 13,8$ $n = 7$	$+64 \pm 15,8$ $n = 8$ +++		
GOT	$0 \pm 3,6$ $n = 10$	$0 \pm 7,8$ $n = 6$	$-5 \pm 6,4$ $n = 6$	$+5 \pm 7,1$ $n = 8$	$+8 \pm 8,2$ $n = 7$	$+27 \pm 9,1$ $n = 8$ +		
GPT	$0 \pm 10,8$ $n = 10$	$0 \pm 7,8$ $n = 6$	$-12 \pm 7,1$ $n = 6$	$+28 \pm 7,6$ $n = 8$	$+14 \pm 11,3$ $n = 6$	$+35 \pm 13,9$ $n = 8$		
ZF	$0 \pm 8,3$ $n = 35$	$+69 \pm 26$ $n = 15$ ++	$+34 \pm 23$ $n = 10$	$+47 \pm 14,7$ $n = 11$ +++	$+35 \pm 19,4$ $n = 9$	$-15 \pm 9,9$ $n = 10$	$+10 \pm 21$ $n = 8$	$+51 \pm 20$ $n = 10$ ++
ME	0 ± 5 $n = 36$	$+51 \pm 19$ $n = 12$ ++	$+6 \pm 11,9$ $n = 10$	$+58 \pm 17,4$ $n = 11$ +++	$+121 \pm 35$ $n = 10$ +++	$+44 \pm 18,3$ $n = 10$ +	$+37 \pm 22,5$ $n = 8$	$+33 \pm 12$ $n = 10$ ++
TSDH	$0 \pm 3,3$ $n = 28$	-3 ± 8 $n = 6$	$+14 \pm 6,7$ $n = 9$	$+46 \pm 9,6$ $n = 11$ ++++	$+79 \pm 15,8$ $n = 10$ ++++	$+68 \pm 8,6$ $n = 10$ ++++	$+37 \pm 10,4$ $n = 8$ ++	$+41 \pm 5,1$ $n = 10$ ++++

Enzymaktivitäten der Leber bei Einwirkung
von 150 mg/kg Phenobarbital pro Tag
Angaben in internationalen Einheiten/g
Frischgewicht.

	K	1. Tag	2. Tag	3. Tag	5.-7. Tag	9.-10. Tag	16.-21. Tag	6 Wochen
LDH	172 n = 30	± 5,16 148 n = 8	134 n = 9	128 n = 12	105 n = 12	101 n = 10	121 n = 8	143 n = 10
GDH	32,2 n = 30	± 1,45 31,2 n = 8	21,8 n = 9	21,8 n = 12	19,7 n = 12	21,3 n = 10	22,3 n = 8	29,3 n = 10
MDH	397 n = 27	± 10,28 390 n = 6	377 n = 6	379 n = 12	369 n = 10	420 n = 10	370 n = 8	393 n = 10
GAPDH	99,5 n = 10	± 2,8 86,5 n = 6	87,0 n = 6	102 n = 8	108 n = 7	90 n = 8		
PGK	128 n = 10	± 3,8 145 n = 6	142 n = 6	145 n = 8	146 n = 7	153 n = 8		
PK	19,8 n = 10	± 1,75 16,3 n = 6	15,3 n = 6	16,0 n = 8	16,5 n = 6	20,7 n = 7		
ALD	4,99 n = 10	± 0,65 6,21 n = 6	4,52 n = 6	4,82 n = 8	4,82 n = 7	5,50 n = 8		
GOT	107 n = 10	± 2,8 108 n = 6	86,1 n = 6	84,8 n = 8	83,1 n = 7	85,2 n = 8		
GPT	7,60 n = 10	± 1,12 7,16 n = 6	5,45 n = 6	6,99 n = 8	5,52 n = 6	6,48 n = 8		
ZF	1,24 n = 35	± 0,105 1,90 n = 15	1,34 n = 10	1,51 n = 11	1,16 n = 9	0,71 n = 10	0,53 n = 8	1,40 n = 10
ME	3,39 n = 36	± 0,17 4,31 n = 12	2,52 n = 10	3,67 n = 11	5,61 n = 10	2,99 n = 10	3,24 n = 8	3,28 n = 10
TSDH	20,3 n = 28	± 0,58 19,8 n = 6	19,0 n = 9	22,1 n = 11	26,2 n = 10	22,7 n = 10	19,0 n = 8	20,1 n = 10

Tabelle 8

Beeinflussung der Enzymaktivitäten der
Leber bei Einwirkung von 150 mg/kg Pheno-
barbital/Tag.

Angaben in prozentualer Veränderung zu
den am gleichen Tage untersuchten Kon-
trolltieren

P	<	0,001	+++
P	<	0,01	+++
P	<	0,02	++
P	<	0,05	+

Tabelle 8

	K	1. Tag	2. Tag	3. Tag	5. - 7. Tag	9.-10. Tag	16.-21. Tag	6 Wochen
LDH	0 ± 3 n = 30	-14 ± 9 n = 8	-12 ± 9 n = 9	$-25 \pm 3,6$ n = 12 +++	$-40 \pm 2,9$ n = 12 +++	$-42 \pm 4,8$ n = 10 +++	$-40 \pm 4,6$ n = 8 +++	$-17 \pm 7,7$ n = 10 +
GDH	$0 \pm 4,5$ n = 30	-3 ± 8 n = 8	-32 ± 4 n = 9 +++	$-32 \pm 5,0$ n = 12	$-40 \pm 3,9$ n = 12 +++	$-34 \pm 4,9$ n = 10 +++	$-28 \pm 2,8$ n = 8 +++	$-9 \pm 7,9$ n = 10
MDH	$0 \pm 2,6$ n = 27	-2 ± 10 n = 6	$-5 \pm 5,4$ n = 6	-4 ± 4 n = 12	-8 ± 5 n = 10	$+5 \pm 4$ n = 10	$-8 \pm 2,6$ n = 8	$-1 \pm 2,8$ n = 10
GLPDH	0 ± 3 n = 10	$-15 \pm 5,2$ n = 6 ++	-7 ± 6 n = 6	$+8 \pm 9$ n = 8	$+14 \pm 9$ n = 7	$-8 \pm 3,9$ n = 8		
PKK	0 ± 3 n = 10	$+13 \pm 12$ n = 6	$+15 \pm 5,6$ n = 6 +	$+13 \pm 5,3$ n = 8 +	$+14 \pm 5$ n = 7 +	$+20 \pm 3,1$ n = 8 +++		
PK	$0 \pm 8,8$ n = 10	-18 ± 8 n = 6	$-22 \pm 9,6$ n = 6	$-19 \pm 9,5$ n = 8	-13 ± 5 n = 6	$+4 \pm 6,3$ n = 7		
ALD	$0 \pm 12,9$ n = 10	$+24 \pm 18$ n = 6	$-10 \pm 9,6$ n = 6	-4 ± 5 n = 8	-4 ± 6 n = 7	$+11 \pm 10,3$ n = 8		
GOT	$0 \pm 2,6$ n = 10	$+1 \pm 7$ n = 6	$-20 \pm 4,8$ n = 6 +++	$-21 \pm 5,4$ n = 8 +++	$-22 \pm 3,3$ n = 7 +++	$-20 \pm 3,6$ n = 8 +++		
GPT	$0 \pm 14,7$ n = 10	-6 ± 6 n = 6	$-28 \pm 6,4$ n = 6	$-7 \pm 5,6$ n = 8	$-27 \pm 6,1$ n = 6	$-15 \pm 7,4$ n = 8		
ZF	$0 \pm 8,4$ n = 35	$+60 \pm 25$ n = 15 +	$+8 \pm 18$ n = 10	$+26 \pm 11$ n = 11	$+5 \pm 15$ n = 9	$-30 \pm 7,7$ n = 10 ++	$-16 \pm 10,3$ n = 8	$+13 \pm 12$ n = 10
ME	$0 \pm 4,5$ n = 36	$+38 \pm 14$ n = 12 +	$-6 \pm 5,3$ n = 10	$+17 \pm 9$ n = 11	$+55 \pm 26$ n = 10 +	$-3 \pm 16,7$ n = 10	$-10 \pm 20,4$ n = 8	-3 ± 5 n = 10
TSDH	$0 \pm 2,8$ n = 28	$-2 \pm 6,9$ n = 6	$-3 \pm 3,9$ n = 9	$+10 \pm 4$ n = 11	$+30 \pm 5,6$ n = 10 +++	$+16 \pm 5,0$ n = 10 ++	$-6 \pm 1,3$ n = 8	$-1 \pm 6,0$ n = 10

Enzymgehalte der Gesamtleber bei Einwirkung
von 10 mg/kg Aldrin p.Tag. Größenangaben in
IE/Gesamtleber einer 25 gr schweren Maus.

Tabelle 9

	K	1. Tag	2. Tag	3.-6. Tag	9.-11. Tag
LDH	236 n = 30 ± 7,6	229 n = 4	199 n = 5	228 n = 4	222 n = 4
GDH	43,4 n = 30 ± 1,76	43,5 n = 4	29,7 n = 4	44,8 n = 4	50,3 n = 4
MDH	545 n = 27 ± 18,3	540 n = 2	610 n = 2	830 n = 4	930 n = 4
2F	1,60 n = 35 ± 0,134	2,26 n = 10	2,18 n = 8	1,51 n = 4	2,00 n = 4
LE	4,30 n = 36 ± 0,224	5,57 n = 8	4,88 n = 6	8,50 n = 4	6,23 n = 4
TSDH	27,8 n = 28 ± 0,92	28,1 n = 4	32,2 n = 3	44,0 n = 4	63,15 n = 4

Tabelle 10

Beeinflussung der Enzymgehalte der Gesamtleber bei Einwirkung von 10 mg/kg Aldrin/Tag.

Angaben in prozentualer Veränderung zu den am gleichen Tage untersuchten Kontrolltieren.

	K	1. Tag	2. Tag	3.-6. Tag	9.-11. Tag
LDH	$0 \pm 3,2$ $n = 30$	$- 2 \pm 3$ $n = 4$	$- 11 \pm 2$ $n = 5$	$- 4 \pm 6$ $n = 4$	$- 6 \pm 5,9$ $n = 4$
GDH	$0 \pm 4,0$ $n = 30$	$- 5 \pm 4$ $n = 4$	$- 20 \pm 8$ $n = 4$	$+ 10 \pm 8,7$ $n = 4$	$+ 16 \pm 4,4$ $n = 4$
MDH	$0 \pm 3,3$ $n = 27$	$+ 3 \pm 2$ $n = 2$	$+ 16 \pm 8$ $n = 2$	$+ 68 \pm 11,8$ $n = 4$	$+ 74 \pm 13,7$ $n = 4$
ZF	$0 \pm 8,3$ $n = 35$	$+ 48 \pm 16,5$ $n = 10$	$+ 11 \pm 13$ $n = 8$	$- 20 \pm 11$ $n = 4$	$+ 17 \pm 9$ $n = 4$
ME	0 ± 5 $n = 36$	$+ 30 \pm 11$ $n = 8$	$+ 13 \pm 20$ $n = 6$	$+ 116 \pm 31$ $n = 4$	$+ 65 \pm 21$ $n = 4$
TSDH	$0 \pm 3,3$ $n = 28$	$+ 18 \pm 5$ $n = 4$	$+ 22 \pm 7$ $n = 3$	$+ 95 \pm 8,5$ $n = 4$	$+ 115 \pm 13,5$ $n = 4$

Enzymaktivitäten Leber bei Einwirkung
von 10 mg/kg Aldrin pro Tag.

Angaben in IE pro gr. Frischgewicht.

Tabelle 11

	K	1. Tag	2. Tag	3.-6. Tag	9.-11. Tag
LDH	172 n = 30 ± 5,16	176 n = 4	135 n = 5	122 n = 4	89 n = 4
GDH	32,2 n = 30 ± 1,45	33,4 n = 4	19,4 n = 4	23,5 n = 4	20,1 n = 4
MDH	397 n = 27 ± 10,28	390 n = 2	385 n = 2	432 n = 4	372 n = 4
ZF	1,24 n = 35 ± 0,105	1,75 n = 10	1,52 n = 8	0,815 n = 4	0,80 n = 4
ME	3,39 n = 36 ± 0,17	4,16 n = 8	3,25 n = 6	4,40 n = 4	3,16 n = 4
TSDH	20,3 n = 28 ± 0,58	21,6 n = 4	23,0 n = 3	25,8 n = 4	25,4 n = 4

Beeinflussung der Enzymaktivitäten der
Leber bei Einwirkung von 10 mg/kg
Aldrin /Tag.

Angaben in prozentualer Veränderung zu
den am gleichen Tage untersuchten Kon-
trolltieren.

Tabelle 12

	K	1. Tag	2. Tag	3.-6. Tag	9.-11. Tag
LDH	0 ± 3 n = 30	$- 3 \pm 2$ n = 4	$- 25 \pm 5$ n = 5	$- 37 \pm 9$ n = 4	$- 51 \pm 6,2$ n = 4
GDH	$0 \pm 4,5$ n = 30	$- 8 \pm 6$ n = 4	$- 30 \pm 9$ n = 4	$- 28 \pm 9,2$ n = 4	$- 39 \pm 3,5$ n = 4
KDH	$0 \pm 2,6$ n = 27	$+ 2 \pm 0$ n = 2	$- 6 \pm 4$ n = 2	$+ 1 \pm 8$ n = 4	$- 3 \pm 10$ n = 4
ZF	$0 \pm 8,4$ n = 35	$+ 41 \pm 12,6$ n = 10	$- 8 \pm 27$ n = 8	$- 48 \pm 7$ n = 4	$- 50 \pm 11$ n = 4
ME	$0 \pm 4,5$ n = 36	$+ 24 \pm 9$ n = 8	$- 16 \pm 8$ n = 6	$+ 30 \pm 9$ n = 4	$- 12 \pm 14$ n = 4
TSDH	$0 \pm 2,8$ n = 28	$+ 17 \pm 8$ n = 4	$+ 2 \pm 4$ n = 3	$+ 24 \pm 5,1$ n = 4	$+ 16 \pm 6$ n = 4

Tabelle 13

Veränderungen der Substratspiegel während der Lebervergrößerung durch Phenobarbital (150 mg/kg tägl. im Trinkwasser).

Gehaltsangaben: Glycogen und Glucose in Micromol/g Frischgewicht
Gehalte der übrigen Metabolite in $\mu\text{mol/g}$.

Substrat	Kontrolle		Phenobarbital			
	(n = 38)		1.-2.Tag (n = 26)		3.-7.Tag (n = 40)	
			% Veränderung	P	% Veränderung	P
Glycogen	221 $\pm$ 16	μmol	- 29	+	- 22	++
Glucose	18 $\pm$ 1.3	μmol	- 24	+	- 30	++
Fructose-1,6-diphosphat	56 $\pm$ 2.6	μmol	+ 18		+ 20	
Glucose-6-P	470 $\pm$ 19	"	- 27	++	- 19	++
Glyceraldehyd-P	24 $\pm$ 8	"	+ 4		+ 4	
Dihydroxyaceton-P	43 $\pm$ 17	"	- 6		- 4	
1,3-Glycerol-P	20 $\pm$ 1.0	"	+ 8		+ 5	
α -Glycerol-P	646 $\pm$ 36	"	- 18	+	- 16	
Phosphoenol-pyruvat	56 $\pm$ 2.9	"	+ 4		+ 6	
Pyruvat	89 $\pm$ 6.4	"	+ 26	+	+ 26	++
Lactat	3380 $\pm$ 191	"	- 37	+++	- 12	
Oxalacetat	30 $\pm$ 1.7	"	+ 17		+ 30	++
Malat	464 $\pm$ 31	"	- 5		- 17	
Isocitrat	47 $\pm$ 4.0	"	+ 6		+ 6	
Citrat	421 $\pm$ 63	"			+ 16	
α -Ketoglutarat	57 $\pm$ 2.3	"	+ 7		+ 12	
α -Glycerol-P	13.6 $\pm$ 0.9	"	- 27	+	- 14	++
Dihydroxyaceton-P						
Lactat	31.5 $\pm$ 2.5	"	- 47	+++	- 30	+++
Pyruvat						
Malat	19.6 $\pm$ 2.1	"	- 19		- 25	++
Oxalacetat						

P < 0.01 = +
P < 0.005 = ++
P < 0.001 = +++

Tabelle 14

Vergleich von Tiergewicht und Enzymaktivität
in IE/g Leber

	Gewicht (Mittel- wert)	Relati- ves Le- bergew.	ZF	ME	IDH	LDH	GDH	MDH
Mäuse bis 25 g	22,7g	47,5	2,45	4,20	24,4	177	32,3	450
Mäuse 26-29g	27,7g	50,4	1,81	3,83	19,7	156	30,4	401
Mäuse bis 30 g u.m.	32,7	52,0	1,25	3,08	20,9	168	33,0	397

Verzeichnis der gebrauchten Abkürzungen

ADP	Adenosin - 5- diphosphorsäure
ALD	Fructose-1.6 Diphosphat-Aldolase
ATP	Adenosin-5-triphosphorsäure
BTS	Brenztraubensäure
c	Konzentration in mg /ml
DAP	Dihydroxyacetonphosphat
DPN/DPNH	Diphosphopyridinnucleotid
EDTA	Äthylendiamintetraacetat
FDP	Fructose-1-6-phosphat
F-6-p	Fructose-6-phosphat
F-6-PK	Fructose-6-phosphat-Kinase
GAP	Glycerinaldehydphosphat
GAPDH	Glycerinaldehydphosphat-Dehydrogenase
GDH	Glycerophosphat-Dehydrogenase
GOT	Glutamat-Oxalacetat-Transaminase
α -GP	-Glycerophosphat
α -Gpox	-Glycerophosphat-Oxydase
G-6-p	Glucose-6-phosphat
GPT	Glutamat-Pyruvat-Transaminase
GSH	Glutathion
IDH	Isocitrat-Dehydrogenase
α -KGS	-Ketoglutarat
LDH	Lactat-Dehydrogenase
MDH	Malat-Dehydrogenase
ME	Malic enzyme
PEP	Phosphorendolpyruvat
PGK	Glycerat-3-phosphat-Kinase
3-PGS	3-Phosphoglycerat
PK	Pyruvatkinase
TIM	Triose-Isomerase
TFN/TPNH	Triphosphorpyridinnucleotid
TRA	Triäthanolamin-Hydrochlorid

Literatur

- 1) Beisenherz, G. , Boltze, H.J., Bücher, Th., Czock, R., Garbade, K.H.
Meyer-Arend, E., Pfeleiderer, G.:
Zeitschr.f.Naturf. 8b. Heft 10, 555 (1953)
- 2) Bosch, G., Dissertation Marburg 1966
- 3) Bücher, Th., Klingenberg, M.:
Angew.Chem. 70. 552 (1958)
- 4) Boxer, G.E., Shonk, C.E.:
Cancer Res. 20. 86 (1960)
- 5) Conney, A.M., Garren, L.:
Biochem.Pharmacol. 6. 257 (1961)
- 6) Delbrück, A., Schimassek, H., Bartsch, K., Bücher, Th.:
Biochem.Z. 331. 297 (1959)
- 7) Eastabrook, R.W., Cooper, D. u. Rosenthal, O.:
Biochem.Z. 338. 741 (1963)
- 8) Fouts, J.R., Rogers, L.A.:
J.Pharmacol. exp.Thér. 147. 112 (1965)
- 9) Gallapher, C.P., Judah, S.D., Rees, K.J.:
J.Path.Bact. 72. 241 (1956)
- 10) Gillette, J.R., Brodie, B.B., La Du, B.N.:
J.Pharmacol.exp. Thér. 119. 532 (1957)
- 11) Hess, R., Stäubli, W., Riess, W.:
Nature(London) 853. 208 (1965)
- 12) Kiese, M., Redoxfunktionen cytoplasmatischer Strukturen.
Wiener med.Akademie, Wien 1962, S.22-27
- 13) Kirchberg, H.J. Dissertation Marburg 1966
- 14) Klingenberg, M., Bücher, Th.:
Ann.Rev.Biochem.29. 669 (1960)
- 15) Klingenberg, M., persönl.Mitteilung
- 16) Knox, W.E.,
Ciba Found.Symp.on Enzymes and Drug Action, London 1962
- 17) Kunz, W., Schaudé, G., Schmid, W., Siess, M.
Arch.f.Pharmakologie u.exp.Pathologie 254. 470 (1966)
- 18) Kunz, W., Habilitationsschrift Marburg 1963 u.Räker, O.,
Dissertation Marburg 1965

- 19) Lee, Y.P., Takemori, A. E., Lardy, H.A.:
J.biol.Chem. 234.305 (1959)
- 20) Lee, Y.P., Lardy, H.A.
Fed.Amer.Soc.exp.Biol. 20.224 (1961)
- 21) Netter, K.S. u.G.Seidel:
Naunyn Schmiedeb.Arch.f.Pharmacol.u.exp.Path.245.78 (1963)
- 22) Pette, D.:
Naturwissensch.597.52 (1965)
- 23) Remmer, H.:
Ciba Found.Sympos.on Enzymes and Drug Action.London 276(1962a)
- 24) Remmer, H., Merker, H.J.,
Klin.Wochschr. 41. 276 (1965)
- 25) Remmer, H.:
Symp.Redoxfunktionen cytoplasmatischer Strukturen,
Wien S.79 1962)
- 26) Schimassek, H., Kunz, W., Gallmitz, H.J.
Naunyn Schmiedeb.Arch.f.Pharmakol.u.exp.Path. 251. 195 (1965)
- 27) Shrago, E., Lardy, H.A., Nordl, R.C., Forster, D.O.
J.biol.Chem.238. 3188 (1963)
- 28) Teppermann, H.M. a.Teppermann, J.:
Diabetes 7. 478 (1958)
- 29) Teppermann, H.M. a.Teppermann, J.:
Amer.J.Physiolog. 206. 357 (1964)
- 30) Warburg, O.:
Ergebnisse der Enzym-Forschung 7.210 (1938)
- 31) Weichselbaum, T.E.:
Amer.J.Clin.Techn.Sec.10. 40 (1946)

Am Schluß meiner Arbeit möchte ich mich bei
Herrn Professor Dr. S c h m i d für den
Arbeitsplatz an seinem Institut und für die
Übernahme des Correferates herzlich bedanken.
Ebenso danke ich Herrn Professor Dr. K u n z
sehr herzlich für seine freundliche Hilfe bei
der Anfertigung der Arbeit und für die Übernahme
des Referates.

Verzeichnis meiner akademischen Lehrer

Meine akademischen Lehrer waren die folgenden Herren
Professoren und Dozenten:

in Berlin

Clemens, Drawert, M.H.Fischer, Günther, v. Herrath,
Honerjäger, Jahr, Lautsch, Schütte, Stein, Vogel, Urich.

in Tübingen

v. Brunn, Dick, Fischer, Gohrbrandt, Knoerr, Lembeck,
Letterer, Missmahl, Ott, Roemer, Spechter, Zeh.

in Marburg

Beckmann, Berendes, Bock, Braun-Falco, du Mesnil, Exner,
Gedigk, Hamm, Hartmann, Hildebrandt, Hornung, Huber, Jacob,
Linneweh, Martini, Marx, Maurath, Neubauer, Sauer, Schleyer,
Schmid, Schölmerich, Schrappe, Schwaiger, Siegert, Siess,
Straub, Streicher, Würterle.

L e b e n s l a u f

Am 21. Mai 1939 wurde ich als Sohn des Pfarrers Heinrich Miehe und seiner Ehefrau Käthe geb. Förster in Heuckewalde Krs. Zeitz geboren. Von 1945 bis zu unserem Umzug nach Darlingerode Krs. Wernigerode im Herbst 1951 besuchte ich die Grundschule in Heuckewalde, danach die Thomas-Müntzer-Schule in Wernigerode und von 1953 bis zu meinem Abitur im Mai 1957 die Gerhart-Hauptmann-Oberschule in Wernigerode. Zunächst studierte ich 4 Semester Theologie an der Humboldt-Universität in Ost-Berlin. Im Sommersemester 1959 begann ich an der Freien Universität in West-Berlin mit dem Medizinstudium, wo ich nach dem Sommersemester 1961 die Ärztliche Vorprüfung ablegte. Ich setzte mein Studium mit einem Semester in Tübingen fort und studierte dann anschließend in Marburg/Lahn. Dort bestand ich am 15.3.1965 das Medizinische Staatsexamen. Vom 1.4.1965 an war ich als Medizinalassistent am Pharmakologischen Institut der Universität Marburg tätig. Dort brachte ich meine Doktorarbeit zum Abschluß. Seit dem 1.4.1966 bin ich als Medizinalassistent - Chirurgische Abteilung - beim Städtischen Krankenhaus in Schwelm/Westf. tätig gewesen und ab 1.11.1966 setzte ich meine Ausbildung auf der Inneren Abteilung des Wenckebach-Krankenhauses, Berlin-Tempelhof, fort.

